



**ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN
VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto**

**ISBN: 978-84-693-6292-1
Dipòsit Legal: T-1602-2010**

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Química



Tesis Doctoral

ESTUDIO SOBRE LA
DETERMINACIÓN DE AMINAS
BIÓGENAS EN VINOS POR *HPLC*

OLGA BUSTO BUSTO

Tarragona, 1996

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

LA QUÍMICA DEL VINO

Esta expresión, título de gran número de libros de enología, ha adquirido actualmente una connotación francamente peyorativa en el espíritu de un público desconocedor, por otra parte, tanto de la química como del vino.

La química es temida como si ocultase con artificios vituperables un producto sintético, una especie de vino en polvo. El término alquimia sería en este sentido más acertado, sin duda porque sobre ella se sobreentienden oscuras e ineficaces teorías.

Con todo, yo conozco una manera de emplear la palabra química sin herir la susceptibilidad de nadie: basta con pluralizarla y asociarla un adjetivo que evoque cierta magia. "Las misteriosas químicas de la cata del vino" es una locución que se introduce bien en la conversación. De este modo el aficionado evoca cierta poesía que le hace confiar en una ciencia que le da miedo.

*Émile Peynaud
Le Vin et Les Jours*



Giovanni Stradano, *Gli alchimisti*

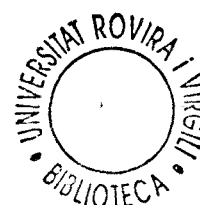
0101-01660



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Química

Àrea de Química Analítica



**ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE
AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC**

Memoria presentada por
OLGA BUSTO BUSTO
para optar al grado de
Doctor en Ciencias Químicas

Tarragona, Julio de 1996



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

ESCOLA D'ENOLOGIA DE TARRAGONA

Ramón y Cajal, 70
43005 Tarragona
Tel. (977) 22 95 96
Fax (977) 24 23 21

Dr. Josep Guasch i Torres, Profesor Catedrático de Escuela
Universitaria de Química Analítica de la Universitat Rovira i Virgili, y

Dr. Francesc Borrull i Ballarín, Profesor Titular de Química Analítica
de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo, titulado "ESTUDIO SOBRE LA
DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR
HPLC" y presentado por Olga Busto Busto para optar al grado de
Doctor en Ciencias Químicas, ha sido realizado bajo nuestra dirección
en el Área de Química Analítica del Departamento de Química, siendo
todos los resultados obtenidos fruto de los experimentos realizados
por la doctoranda en el Laboratorio de Instrumentación Analítica de la
Escuela de Enología de Tarragona.

Y para que conste, expedimos el presente certificado en Tarragona, a
dos de mayo de 1996

Dr. Josep Guasch i Torres

Dr. Francesc Borrull i Ballarín

Esta memoria culmina el trabajo de investigación que he realizado, durante los últimos cuatro años, en la Escuela de Enología de Tarragona.

Es, supongo que por ser la Tesis Doctoral, especialmente importante, no sólo para mí sino, me consta, para toda mi familia. Sé que a mis padres este trabajo les hacía desde el principio mucha ilusión y, por eso, he puesto todo mi entusiasmo en que fuera lo más parecido a lo que deseaban. Porque me han ayudado a conseguir este objetivo para ellos, quiero manifestar mi agradecimiento más sincero a las siguientes personas:

Al Dr. Borrull y al Dr. Guasch, porque apostaron por mí y por esta Tesis. Quiero agradecerles todo el esfuerzo que han dedicado a que saliera bien. La amistad que me han brindado es algo que espero conservar durante mucho tiempo.

A Cristina, Yolanda, Montse Mestres, Montse Miracle, Juan y Jaume por su inestimable ayuda y porque su compañía y su apoyo han hecho que, hasta los días de trabajo infructuoso, hayan sido agradables.

A todas las personas de la Escuela de Enología por las veces que han soportado mis manías con los libros, con los horarios y con tantas otras cosas que seguro que ellos recuerdan mejor que yo.

A Agustí, Guillermo y Ramón, por todas las veces que han hecho suyos mis problemas en el laboratorio.

A Gema y a mi hermano, por la paciencia que han tenido conmigo los últimos días de redacción y por el pequeño gran granito de arena que han aportado.

A toda mi familia y mis amigos y, en especial, a Dany, Fran y Lolina, porque se han ilusionado conmigo en todos y cada uno de los pequeños éxitos recogidos en este trabajo.

Ricard, desde estas páginas, tan tuyas como mías, sólo quiero decirte: GRACIAS. Habría sido imposible hacer todo esto sin estar tú a mi lado.

*A mis padres y a Ricard,
con todo mi cariño, por todo*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

ÍNDICE

Objetivos	1
Capítulo I:	5
Presentación	7
Bibliografía	15
Capítulo II:	17
Introducción	19
Origen de las aminos biógenas en vinos	26
Análisis de aminos biógenas en vinos	29
Técnicas de <i>clean up</i> aplicadas a vinos	32
Filtración	33
Extracción líquido-líquido	33
Cromatografía iónica	34
Extracción en fase sólida	35
Otros tratamientos	37
Técnicas analíticas aplicadas a vinos	37
Técnicas no cromatográficas	38
Cromatografía de capa fina	39
Cromatografía de gases	39
Cromatografía de intercambio iónico	40
Cromatografía líquida de alta resolución	40
La inyección directa	41
La derivatización	42
Los derivatizantes	46
La detección	51
Bibliografía	53
<i>Biogenic Amines in Wine: A Review of Analytical Methods</i>	57

	<i>Índice</i>
Capítulo III:	89
Introducción	91
Bibliografía	103
<i>Solid Phase Extraction Applied to the Determination of Biogenic Amines in Wines by HPLC</i>	105
Capítulo IV:	125
Introducción	127
Bibliografía	138
<i>Determination of Biogenic Amines in Wine After Clean Up by SPE</i>	139
Capítulo V:	157
Introducción	159
Bibliografía	166
<i>Improvement of a Solid Phase Extraction Method for Determining Biogenic Amines in Wines</i>	167
Capítulo VI:	187
Introducción	189
Bibliografía	208
<i>Determination of Biogenic Amines in Wine after Precolumn Derivatization with 6-aminoquinolyl-n-hydroxysuccinimidyl Carbamate</i>	211
Capítulo VII:	229
Introducción	231
Bibliografía	235
<i>Solid Phase Extraction of Biogenic Amines from Wine before Chromatographic Analysis of Their AQC-derivatives</i>	237

	<i>Índice</i>
Capítulo VIII:	253
Introducción	255
Bibliografía	262
<i>Determination of Biogenic Amines in Wines by HPLC with On-Column Fluorescence Derivatization</i>	263
Conclusiones	285
Epílogo	295

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

Objetivos

La revisión bibliográfica efectuada sobre los aspectos relacionados con la analítica de las aminos biógenas en vinos, pone de manifiesto la necesidad de disponer de nuevos métodos de análisis, más robustos y generalizables que los propuestos hasta el momento.

Basados en este planteamiento, los objetivos que se propone abordar este trabajo son:

- 1.- Establecer, mediante cromatografía líquida de alta resolución, diferentes métodos de cuantificación de aminos biógenas en vinos cuya presencia, a distintos niveles, es indicativa de la calidad del vino.
- 2.- Comprobar la efectividad de la técnica de la extracción en fase sólida como sistema de *clean up* de la muestra y de concentración de las aminos en el vino.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

CAPÍTULO I

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

El vino, que Pasteur consideró como la más sana e higiénica de las bebidas, no es una sustancia química cuya composición obedezca a una fórmula definida. Hasta el siglo XVII, resultó ser un producto de naturaleza inviolable cuya calidad estaba ligada a las prácticas enológicas propias de cada bodega. A partir de ese siglo, empezaron a introducirse las técnicas de *coupage* con el fin de asegurar y mantener una calidad supeditada hasta ese momento a la variabilidad de factores tan aleatorios como una meteorología adversa. De esa manera tan simple se marca el comienzo de la eventual adulteración de los caldos.

Con la perspectiva que proporcionan el progreso de la química y el mejor conocimiento de los constituyentes de los vinos, actualmente se plantean objetivos más ambiciosos, entre los que no sólo se incluye la posibilidad de efectuar mezclas de vinos, sino de rectificar la ausencia de alguno de sus componentes, modificar sus propiedades o potenciar sus cualidades de forma que se obtengan productos enológicamente correctos y con *bouquet* original, aunque siempre respetando los márgenes estrictos de la ley.

No obstante, desde los orígenes de la química de los alimentos (recordemos que el vino responde a la definición de alimento), ésta ha estado unida a la adulteración de los mismos en una medida grave y confusa. La necesidad de detectar las impurezas de los alimentos ha sido el principal motor de desarrollo de la química analítica en general y de la química analítica de los alimentos en particular, comenzando su auge más espectacular a partir de 1920 como consecuencia de las presiones legales y la disponibilidad de métodos de detección eficaces [1]. Desde entonces y hasta la fecha, la situación ha mejorado gradualmente a expensas de las metodologías analíticas que han ido perfeccionándose progresivamente.

La milenaria tradición vitivinícola española, junto con la notable riqueza y diversidad de climas, suelos, variedades de vid, métodos de cultivo y de elaboración (elementos todos ellos que determinan el carácter del vino) conllevan la existencia de una gama amplísima de vinos. La imagen de calidad que estos vinos proyectan ante el consumidor siempre aparece ligada al nombre geográfico de procedencia. Este fenómeno, que comenzó a manifestarse hace unos cinco mil años, cristalizó en lo que desde 1932 se conoce como denominación de origen (D.O.) a pesar de que, conceptualmente, a finales del siglo XV ya aparecieron ciertas formas de regulación para la protección de vinos producidos en algunas zonas [2].

La investigación de nuevos métodos de control de calidad, principalmente potenciados por aspectos económicos y mediáticos relacionados con estas D.O., ha asegurado el interés en la detección de posibles anomalías indicadoras de la presencia de sustancias no deseables o extrañas al vino, motivo por el cual algunos países han dictado normas restrictivas referentes a sus importaciones.

De forma más general, todos los alimentos se han visto sometidos a rigurosos controles con el fin de detectar la presencia de sustancias tóxicas. Este objetivo se ha hecho más ambicioso, controlándose hoy en día parámetros que definen características propias de un determinado producto, con el fin de prevenir y evitar fraudes.

En este sentido, las aminos biógenas pueden considerarse incluidas en el grupo de sustancias cuya determinación ha merecido un particular interés en los últimos años.

Las aminos biógenas se encuentran frecuentemente en productos de consumo. Para muchos de nosotros, el contacto principal con ellas se

establece a través del olor del mar y del marisco fresco. Puesto que las aminos se liberan cuando se pudre la carne, el ciclo de la vida de los organismos marinos proporciona un aporte constante de aminos al agua del mar y al aire mediante los océanos.

Este aspecto macabro de la química de las aminos se refleja en los nombres comunes de dos de ellas: *cadaverina* y *putrescina*. Las dos aparecen cuando los tejidos animales se descomponen, siendo responsables del hedor de la carne en putrefacción. Irónicamente, la putrescina no puede considerarse tan sólo como indicadora de signos de putrefacción. Puesto que está presente en todos los tejidos animales y es esencial para el crecimiento de las células, se la puede juzgar indispensable para la vida [3].

Las aminos biógenas provocan en el organismo humano síntomas semejantes a ciertos envenenamientos de naturaleza microbiana. Se detectan sobre todo en los productos fermentados o contaminados por ciertas bacterias. En este sentido, los alimentos de origen marino han sido los más estudiados puesto que fue en ellos en los que se detectó por vez primera un elevado contenido de una de las aminos biógenas a la postre más importantes: la histamina. Así, ha llegado a establecerse incluso un índice de calidad del pescado en función de la interrelación de cinco aminos (histamina, putrescina, cadaverina, espermina y espermidina) que permite conocer el grado de descomposición del mismo [4, 5].

Las aminos biógenas tienen una importancia fundamental en la definición de la calidad organoléptica del vino, siendo también claros exponentes de unas características sanitarias correctas en su elaboración.

La putrescina, al igual que otras poliaminas como la espermina y la espermidina, es un componente natural de los vegetales, sobre todo de sus

hojas y de las uvas, en el caso de las viñas. Además es también producto de la fermentación y, por lo tanto, se la reconoce junto a la histamina, la tiramina, la fenetilamina, la cadaverina y la etanolamina, como una de las aminas mayoritarias en el vino. El resto de aminas, con una incidencia toxicológica menor a nivel individual, se puede considerar como de presencia minoritaria.

Hasta el momento no existe una reglamentación oficial que regule el contenido máximo admisible de aminas biógenas, a pesar de que algunos países han dictado normas de importación restrictivas respecto a los contenidos máximos de histamina [6].

Este tema ha preocupado durante los últimos 25 años a la *Office International de la Vigne et du Vin (OIV)*, motivo por el cual se ha iniciado, a instancias de este organismo, una recogida de datos de contenidos de aminas biógenas en vinos de todo el mundo. En este sentido, también se ha potenciado, sobre todo en la última década, la investigación de técnicas analíticas que permitan obtener de forma fidedigna estos datos.

Es el impacto comercial que el establecimiento de una metodología analítica, válida para la determinación sistemática de aminas biógenas en vinos, el que animó al grupo de Química Analítica emplazado en la Escuela de Enología de Tarragona a iniciar este trabajo.

Sobre las bases de estudios que esta misma área había realizado anteriormente en la Facultad de Química, empezó a construirse esta Tesis Doctoral cuya parte experimental se ha desarrollado íntegramente en el Laboratorio de Instrumentación Analítica de la Escuela de Enología de nuestra Universidad.

El objetivo fundamental de este trabajo ha sido investigar cuál es el rol que la cromatografía líquida de alta resolución (en su modalidad de fase inversa) y la extracción en fase sólida pueden desempeñar en el establecimiento de métodos de control analítico de aminos biógenos en vinos.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC¹) es una de las técnicas analíticas que ha experimentado mayor avance en los últimos años. La explosión de aplicaciones, métodos, nuevas columnas y detectores es debida a la rapidez de la técnica, su versatilidad, eficacia y conveniencia.

En HPLC la manipulación de la muestra es reducida y el poder de resolución de los empaquetamientos de las columnas actuales, los sistemas de eluyentes y los detectores proporcionan una excelente selectividad para compuestos específicos. Dado que los analitos no tienen que volatilizarse para ser analizados (a diferencia de la cromatografía de gases), sustancias térmicamente sensibles y compuestos de alto peso molecular pueden analizarse formándose pocos productos de degradación. Pueden determinarse tanto los compuestos solubles en medio acuoso como los solubles en medio no acuoso. El tiempo que requiere un análisis cromatográfico es relativamente corto, y los picos de interés pueden resolverse proporcionando datos cuantitativos precisos y exactos. Las posibilidades de la inyección automática y los sistemas de adquisición de datos permiten trabajar de forma automática, ofreciendo ventajas respecto a la optimización del tiempo y minimización de potenciales errores.

Los cromatografistas encuentran frecuentemente problemas en fase inversa para la separación de las muestras que contienen aminos. Los problemas típicos del análisis de muestras básicas son el ensanchamiento de los picos,

¹ Por su carácter universal, se ha considerado conveniente utilizar en la memoria de la tesis los acrónimos propios de la terminología inglesa para designar las diferentes técnicas analíticas

la aparición de picos con colas, un bajo número de platos, tiempos de retención variables y envejecimiento de las columnas, con las consiguientes alteraciones en la separación. Los problemas son normalmente más pronunciados en una columna que en otra y varían con la estructura de la sustancia a determinar. Todos estos problemas están relacionados con el efecto “silanol” que puede compensarse mediante soportes de fases estacionarias adecuados (normalmente tratados mediante técnicas de *end capping*), optimizando el pH de la fase móvil, añadiendo modificadores orgánicos, aumentando la fuerza iónica o bien aplicando algún proceso de acondicionamiento o concentración de la muestra que permita reducir la interacción entre los puntos ácidos del soporte de la columna y las muestras básicas inyectadas.

Respecto a la extracción en fase sólida propiamente dicha (la cromatografía iónica en columna sí ha sido abundantemente utilizada), existen pocos precedentes de aplicación a muestras de vino, aunque sí existen referencias de utilización en otros alimentos. El interés creciente demostrado hacia esta técnica, debido principalmente al alto grado de selectividad conseguido en las fases estacionarias y su sencillez de manipulación, permite obtener métodos robustos de extracción.

La estructura general de la memoria de esta Tesis Doctoral responde a un formato que permite incluir los artículos derivados de la experimentación realizada precedidos por una amplia discusión del proceso que ha dado lugar al método finalmente publicado. Globalmente podemos considerar todo el estudio dividido en dos partes perfectamente diferenciadas.

La primera de ellas (capítulo II) corresponde a la introducción teórica de los diferentes apartados que configuran todo el desarrollo de los métodos optimizados y aplicados en la parte experimental de la tesis.

En este primer apartado se incluye la revisión bibliográfica imprescindible para conocer cuál es el estado actual de la investigación sobre la materia objeto de estudio. Este análisis pormenorizado se ha realizado en base a un artículo de próxima aparición en el *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* y en el que se recogen todos los procedimientos analíticos basados en HPLC aplicados recientemente a la determinación de aminos biógenas en vinos.

La segunda parte de la memoria corresponde a una descripción detallada de los métodos empleados en el aislamiento y determinación cromatográfica de las aminos biógenas en muestras de vinos pertenecientes, principalmente, a las D.O. catalanas.

En el tercer capítulo se describe la optimización de un método de determinación por cromatografía líquida de alta resolución previa derivatización de las aminos con cloruro de dansilo. Este reactivo proporciona derivados estables, permitiendo emplear la etapa de aislamiento y preconcentración de los analitos sobre sus productos de reacción. De esta forma, se compensa la falta de selectividad que comporta el hecho de utilizar un detector UV tras la separación cromatográfica.

La disponibilidad de un sistema de inyección automático permitió plantearse en el cuarto capítulo el uso del derivatizante clásico de aminos biógenas: el *o*-ftaldialdehído. El detector de fluorescencia mejora asimismo la sensibilidad del método de inyección directa previamente ensayado. En el procedimiento de extracción en fase sólida (realizada prederivatización) se aplica un adsorbente de propiedades iónicas.

Las limitaciones que manifiesta el proceso de extracción precedente respecto al tratamiento de muestra (excesivamente largo) y a la escasa recuperación

obtenida para dos de las aminas más importantes, planteó la mejora de este proceso mediante el uso de reactivos formadores de pares iónicos, procedimiento empleado con éxito en otros tipos de muestras de naturaleza acuosa. Es lo que constituye el quinto capítulo.

Aparte de la ya comentada inestabilidad de los derivados obtenidos mediante reacción con *o*-ftaldialdehído, este derivatizante presenta el inconveniente de reaccionar únicamente con aminas primarias, con lo que aminas como la pirrolidina no pueden ser determinadas mediante los procedimientos recogidos en los dos capítulos anteriores. Este es el motivo por el cual se procedió a la búsqueda de un agente derivatizante que compatibilizara las ventajas de sensibilidad y rapidez de reacción del *o*-ftaldialdehído con las del cloruro de dansilo en términos de número de aminas analizables. Este reactivo es el carbamato de 6-aminoquinolil-*n*-hidroxisuccinimidilo de reciente síntesis y comercialización, cuyas características lo presentan como un serio competidor de los reactivos más clásicos. La puesta a punto del método de derivatización y separación cromatográfica, así como el análisis exploratorio de los resultados de la cuantificación de las muestras procesadas, se recogen en el sexto capítulo, mientras que en el séptimo se refleja el estudio realizado con el fin de determinar bajas concentraciones de las aminas de aparición más frecuente en el vino.

Finalmente, con el bagaje adquirido en todos estos trabajos, se procedió a la puesta a punto de un método de determinación que resultara fácilmente aplicable en un laboratorio enológico, de forma que no se requiera una instrumentación especialmente sofisticada y costosa. Recordemos que, exceptuando el primero de los métodos propuestos, en todos los casos se requiere el uso de un inyector automático que asegure al máximo la precisión del método analítico. En este sentido, el octavo capítulo describe

un método de determinación de aminas biógenas mediante derivatización *on-column* con *o*-ftaldialdehído.

A modo de epílogo, se recogen finalmente las conclusiones de todo el trabajo que ha constituido esta Tesis Doctoral.

Todos los métodos propuestos presentan, como veremos, ventajas e inconvenientes. Corresponde al analista, en última instancia, escoger cuál de ellos se adapta mejor a su instrumentación e interés.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. O.R. Fennema y S.R. Tannenbaum. *Química de los alimentos*, cap. I. Ed. Acribia, Zaragoza (1993)
- [2]. J. Serrano. *El Campo* 130:23. Ed. BBV. Bilbao (1994)
- [3]. C.H. Snyder. *The Extraordinary Chemistry of Ordinary Things*, cap. 16. John Wiley & Sons, Nueva York (1995)
- [4]. J.L. Mietz y E. Karmas. *J Food Sci* 42: 155 (1977)
- [5]. J.L. Mietz y E. Karmas. *J Assoc Off Anal Chem* 61: 139 (1978)
- [6]. *Bull OIV* 705-706: 809-810 (1989)
- [7]. P. Pfeiffer y F. Radler. *Am J Enol Vitic* 43: 315 (1992)
- [8]. M. Calull, R.M. Marcé, J. Fábregas y F. Borrull. *Chromatographia* 31:133 (1991)
- [9]. R.E. Subden, R.G. Brown y A.C. Noble. *J Chromatogr* 166: 310 (1978)

CAPÍTULO II

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

1. INTRODUCCIÓN

Las aminas son bases orgánicas de bajo peso molecular cuyas moléculas están formadas por un grupo amino $-NR_1R_2$. Su carácter básico viene marcado por la capacidad de ceder pares de electrones, de acuerdo con los sistemas ácido/base definidos por Brønsted y Lowry. Podemos pensar en ellas como moléculas en las que uno o más de los hidrógenos del amoníaco han sido reemplazados por un grupo alifático o aromático, dando lugar a las especies primarias, secundarias y terciarias, todas ellas menos básicas que el primero. Aquéllas que desempeñan un papel fisiológico o farmacológico destacable reciben el nombre de aminas biógenas.

En general, todas las bases orgánicas muestran propiedades similares a las de los alcaloides, dado que éstos se han descrito en un sentido amplio como compuestos de origen animal o vegetal que contienen átomos de nitrógeno en su estructura. La cafeína y la cocaína se cuentan entre ellos. No obstante, las aminas biógenas no pueden considerarse verdaderos alcaloides dado que el nitrógeno no se encuentra necesariamente formando parte de un heterociclo, condición indispensable para que pudieran ser verdaderos alcaloides. Sin embargo, aminas biosintetizadas a partir de los aminoácidos como la putrescina, la espermidina y la espermina dan lugar a polibases macrocíclicas que sí se consideran alcaloides, lo cual nos indica que la separación entre los dos grandes grupos de bases orgánicas es ciertamente sutil.

Las primeras evidencias de la existencia de aminas biógenas en alimentos se localizan entre finales del siglo XIX y comienzos del XX. Todas ellas están repartidas por la naturaleza en productos de naturaleza animal y vegetal, en productos fermentados y en extractos de levaduras. Pueden formarse por

aminación de aldehídos y cetonas o a partir de la rotura de compuestos nitrogenados, aunque la vía de obtención primordial es la descarboxilación de sus aminoácidos precursores liberados de algunos materiales más complejos (proteínas). En la figura II.1 se muestran las rutas biológicas de formación de histamina, putrescina, cadaverina, espermidina y espermina, cinco de las aminos biógenas más relevantes.

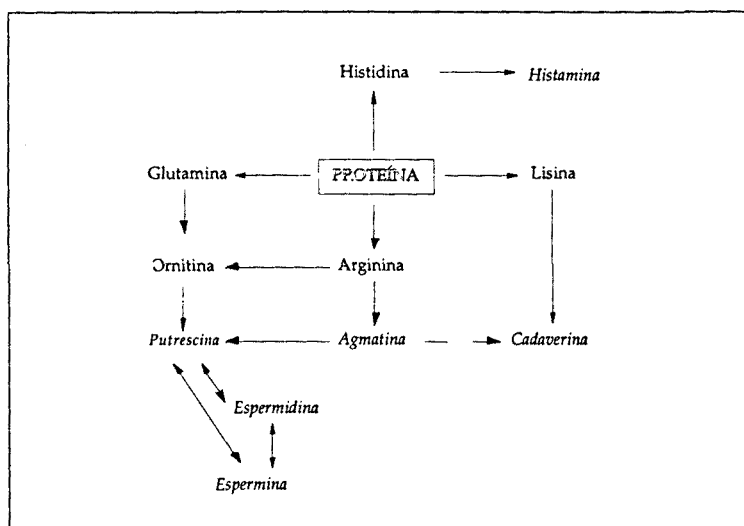


Figura II.1. Rutas biológicas de obtención de algunas aminos biógenas (en cursiva) [1]

Los aguacates, las frambuesas, las naranjas y las espinacas, son alimentos que muestran elevados contenidos de aminos biógenas [1]. Otros productos que también muestran altas concentraciones son aquéllos que han sido sometidos a procesos fermentativos, destacando por su riqueza relativamente elevada (hasta 1 g/kg) los pescados y derivados de la pesca (procesos ligados a la descomposición del producto normalmente), los quesos muy madurados, el chucrut, la cerveza y el vino, aunque en estos últimos los niveles son, en general, muy inferiores (10-20 mg·l⁻¹). Tal vez por

este motivo, inicialmente no se dio importancia a su presencia ni en éstas ni en otras bebidas alcohólicas, a pesar de confirmarse en 1957 su influencia en el aroma y el sabor de cervezas y maltas [2]. La leche, el chocolate y los productos derivados del cacao son otros productos que también contienen aminas biógenas.

Se conocen ya más de 30 aminas biógenas en los alimentos y aunque la histamina y, en menor grado, la tiramina han sido las mejor estudiadas, hoy día interesan también otras como la isoamilamina, la feniletilamina, la metilamina, la etanolamina, el 1,4-diaminobutano (putrescina) y el 1,5-diaminopentano (cadaverina) debido a sus propiedades toxicológicas, a su capacidad de potenciar la toxicidad de la histamina (tiramina, 2-fenetilamina, triptamina, cadaverina y putrescina son potentes inhibidores de los enzimas intestinales que la metabolizan), a su relación con la calidad del alimento (putrescina, cadaverina y espermidina en la carne fresca, dimetilamina en el pescado) o a su papel como indicadoras de síntomas de putrefacción (putrescina y cadaverina principalmente) [1].

En la figura II.2 se muestran las estructuras de las aminas biógenas de interés alimentario que se encuentran con mayor frecuencia en la bibliografía. Muchas de ellas aparecen como consecuencia de un procesado defectuoso del alimento o bien de una conservación incorrecta, aunque como hemos visto la presencia de aminas biógenas en alimentos naturales no procesados también es algo que no ofrece discusión. A pesar de ello, esta presencia puede resultar nociva bajo determinadas circunstancias para el organismo humano.

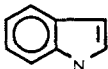
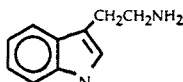
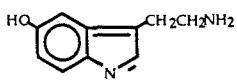

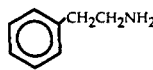
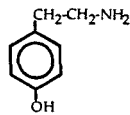




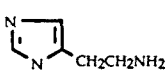
Indol		Metilamina	CH_3NH_2
Triptamina		Dimetilamina	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{N} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Serotonina		Etilamina	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2$
Bencilamina		Dietilamina	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH}_2 \\ \diagup \\ \text{N} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3\text{CH}_2 \end{array}$
Fenetilamina		Propilamina	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Tiramina		Isopropilamina	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{NH}_2$
Piperidina		Butilamina	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Morfolina		Isobutilamina	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Pirrolidina		Pentilamina	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
2-Pirrolidona		Isopentilamina	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Histamina		Hexilamina	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Amoniaco	NH_3	Etanolamina	$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
		2-metilbutilamina	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{NH}_2 \end{array}$
		1,4-diaminobutano	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
		1,5-diaminopentano	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
		Espermidina	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
		Espermina	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
		Agmatina	$\begin{array}{c} \text{N} \\ \\ \text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NHCNH}_2 \end{array}$

Figura II. 2. Estructuras de las aminas alifáticas más comunes encontradas en alimentos

La primera noción de intoxicación por consumo de alimentos con alto contenido en aminas biógenas data del año 1946. Fue concretamente la histamina encontrada en una partida de atún mal conservado, la que introdujo el popular concepto de intoxicación histamínica [3].

Desde ese momento, son muchas las aportaciones de investigadores que confirman la posible influencia patológica de las aminas biógenas. Agmatina, cadaverina, histamina, putrescina, espermidina y tiramina son aminas que parecen estar directamente implicadas en reacciones alérgicas. La histamina puede ser un agente causante de agotamiento fisiológico después de la ingestión de vino tinto, siendo los síntomas más habituales el enrojecimiento facial, la congestión nasal, las náuseas y el dolor de cabeza. Los vinos blancos casi nunca están implicados en este tipo de síntomas, presumiblemente porque las técnicas de vinificación en tinto conllevan un mayor aporte de histamina que las de vinificación en blanco [1]. No obstante, algunos autores [4] no han encontrado ninguna relación entre la ingestión de histamina y estos síntomas en un experimento en el que administraron zumo de manzana y vino con altos contenidos de histamina a una treintena de individuos. Otros investigadores sugieren que el alcohol vínico estimula la liberación de la histamina endógena y que el vino blanco no afecta a los niveles de histamina en sangre [5].

Los efectos toxigenicos que presentan las aminas biógenas se deben principalmente a sus propiedades vasopresoras y desencadenantes de migrañas. La fenetilamina y la tiramina, por ejemplo, son aminas consideradas como hipertensivas. La segunda de ellas, además, influye en la incorporación en sangre de histamina [6] la cual, a diferencia de las dos anteriores, es hipotensiva [7]. La putrescina y la cadaverina, por su parte, pueden convertirse en nitropirrolidina y nitropiperidina, compuestos

altamente carcinogénicos y la serotonina, entre otras aminos encontradas en vinos, está implicada en la adicción al alcohol [8].

La intoxicación por aminos biógenas la mayoría de las veces es leve pero tiene lugar de forma evidente y remite espontánea y rápidamente tomando antihistamínicos. Muchas veces, más bien por razones de proteccionismo de mercado, se tiende a sobrevalorar este problema toxicológico, que en sí es trivial, salvo en casos muy especiales y en los que concurre un consumo coincidente con otros alimentos ricos en aminos, un consumidor con capacidades enzimáticas mono-amino-oxidásicas (MAO) genéticamente deficitarias o un consumidor bajo tratamiento médico con antidepresivos o antiinfecciosos inhibidores de la MAO (IMAO) [9].

En el caso concreto de la tiramina, la ingestión de 6 mg de la misma produce un incremento de la presión sanguínea y 25 mg pueden considerarse peligrosos en el caso de individuos sometidos a tratamiento con IMAO dado que puede desencadenarles una crisis hipertensiva.

Uno de los problemas que presenta la ingestión de aminos es que entre ellas puede producirse un efecto simpatomimético [3] que, por otro lado, puede potenciarse en presencia de alcohol [10]. Este factor será determinante, pues, en el consumo de vinos con contenidos anormalmente altos de aminos biógenas. Concretamente, se ha relacionado la aparición de migrañas con la ingestión de medio litro de vino con concentraciones de histamina superiores a 5 mg·l⁻¹ [11].

A pesar de ser conocida su incidencia toxicológica sobre la salud humana, no existen hasta el momento límites legales de concentración de aminos biógenas en alimentos. Parece viable que en un futuro próximo sí puedan

establecerse reglamentaciones, sobre todo a nivel de importación, ligadas a diferentes problemas suscitados en algunos países europeos.

Dado que los pescados han sido los alimentos tradicionalmente relacionados con la presencia de aminas biógenas, la mayor parte de las normativas se refieren a estos productos, obviando su presencia en otros [12]. Para el resto de alimentos, solamente la legislación suiza fija un valor de concentración en histamina por encima del cual pueden rechazarse los productos destinados al consumo humano, aunque en el caso concreto de los productos marinos, Finlandia, Suecia y Austria también hay dictado leyes restrictivas al respecto [13-15].

A nivel enológico, la OIV ha dado a conocer algunos datos orientativos basados en trabajos realizados en laboratorios suizos, concretamente relacionados con el contenido máximo de histamina en los alimentos. Ya en 1984, la legislación de este país fijó en $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ este valor, indicando que este nivel es indicativo, más que de nocividad, de unas prácticas enológicas defectuosas. Este nivel los Países Bajos lo redujeron en 1990 a $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Como consecuencia de los síntomas de envenenamiento producidos por un vino bordelés que contenía $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de histamina, el Comité Científico de Alimentación de la Unión Europea (UE) decidió fijar entre 3.5 y $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ el nivel de concentración por encima del cual los vinos son considerados no potables [16], aunque existen contradicciones al respecto [12]. Asimismo considera que una concentración elevada de histamina está frecuentemente relacionada con altos contenidos de tiramina y de putrescina, potenciando esta última los efectos fisiológicos de las dos anteriores.

Todos estos datos nos aproximan a la idea de que no existe un criterio unificado a la hora de establecer la normativa legal pertinente.

2. ORIGEN DE LAS AMINAS BIÓGENAS EN LOS VINOS

Dilucidar cuál es el origen de las aminas en los alimentos es otro de los objetivos a conseguir. Se sabe que todos los alimentos de procedencia animal que no han sido procesados están prácticamente exentos de aminas [17]. Por el contrario, aquéllos que han sido sometidos a algún tipo de tratamiento como la conserva o la fermentación sí pueden presentar altos contenidos de aminas biógenas. Este es el caso, como ya se ha mencionado, del queso [18] y las conservas de pescado [19].

Deben asimismo considerarse los productos de procedencia vegetal y, principalmente, aquéllos que dan lugar a bebidas alcohólicas fermentadas como las cervezas [2] o los vinos [12]. Dado que son el eje central de esta tesis doctoral, nos centraremos en estos últimos.

Existe una gran controversia sobre el origen de las aminas en los vinos motivada por el hecho que su aparición parece producirse de manera aleatoria como consecuencia de una serie de transformaciones bioquímicas producidas por ciertos microorganismos. Se forman mayoritariamente por descarboxilación de un aminoácido libre mediante un sistema de enzimas bacterianas, bajo unas condiciones favorables concretas como el pH, la temperatura o los nutrientes. En la tabla II.1 se indican aquellos aminoácidos que por su estructura pueden considerarse precursores de las aminas estudiadas en esta tesis doctoral, lo cual no quiere decir que sea la única fuente de aporte de la amina en cuestión. En el caso de la dietilamina, la hexilamina y la morfolina, no ha sido posible correlacionarlas (basándonos en la bibliografía consultada) con algún aminoácido precursor.

Aminoácido	Amina
Histidina ^a	Histamina
Fenilalanina ^a	2-Fenetilamina
Tirosina	Tiramina
Ornitina/Arginina ^a	Putrescina
Lisina ^a	Cadaverina
Serina/Isoserina	Etanolamina
Hidroxitriptófano	Serotonina
Triptófano ^a	Triptamina
Ornitina/Prolina	Pirrolidina
Isoleucina	2-Metilbutilamina
Glicina	Metilamina
Alanina	Etilamina
α/γ -Aminobutírico	Propilamina
β -Aminobutírico	Isopropilamina
	Dietilamina
2-Metilalanina	Dimetilamina
	Hexilamina
Norleucina	Amilamina
Leucina ^a	Isoamilamina
Norvalina	Butilamina
Valina ^a	Isobutilamina
	Morfolina

Tabla II.1. Aminas producidas por descarboxilación de los aminoácidos precursores que se indican. ^a Esenciales

Otra vía de aparición de aminas biógenas parece ser la resultante de la transaminación de ciertos aldehídos [20], aunque esta vía ha sido menos estudiada.

Los bajos niveles de concentración de aminas biógenas hallados en mostos, hace suponer que la formación de las mismas tiene lugar durante la vinificación, aunque no existe una opinión generalizada del estadio que realmente condiciona su aparición. Así, existen estudios que indican que la aparición de ciertas aminas biógenas como la etanolamina comienza durante la fermentación alcohólica [21-23], mientras que en otros no se manifiesta ninguna relación [24], incluso en presencia de contenidos elevados de sus aminoácidos precursores.

La opinión más generalizada respecto a este tema es que el aporte más importante de aminas biógenas se produce durante la fermentación maloláctica [21, 25]. Por lo tanto, controlando esta etapa, principalmente en términos de pH y de sulfitado del vino [21], puede influirse en su aparición. No obstante, existe una gran controversia respecto a esta afirmación, dado que algunos autores han señalado la disminución de la concentración de histamina durante la mencionada etapa fermentativa [23, 24].

Los vinos tintos presentan una mayor concentración de aminas biógenas que los vinos blancos, lo cual podría corroborar la hipótesis de la relación con el desarrollo de la fermentación maloláctica, al darse ésta primordialmente en los primeros. También se ha relacionado el bajo contenido en aminas biógenas que presentan los vinos blancos con el uso de bentonita en la etapa de clarificación [21, 23] y con el tipo de levaduras empleadas [23, 26] en el proceso de vinificación, las cuales permanecen en contacto con las lías en la vinificación en tinto [27]. Como es sabido, las levaduras contienen sustratos ricos en histamina y tiramina [23].

La evolución del contenido en aminas biógenas, no obstante, no sigue una tendencia uniforme para todos los vinos ni para todas las aminas y depende, en cualquier caso, de variables como la temperatura, el pH y el tipo de microorganismo empleado en la vinificación [23]. Por otro lado, los fertilizantes nitrogenados utilizados en el viñedo, las levaduras, la duración de la maceración y de la fermentación alcohólica, así como el tipo de madera de las barricas, influyen en el contenido en aminas biógenas [27, 28].

Finalmente, también se ha intentado correlacionar (aunque de forma infructuosa) la aparición de aminas biógenas con el deterioro del vino [29], dado que en otros productos como el pescado o la carne sí ha podido establecerse esta relación.

3. ANÁLISIS DE AMINAS BIÓGENAS

La preocupación pública por la inocuidad de los alimentos suscita un interés creciente hacia el establecimiento de métodos analíticos fiables que permitan un control adecuado de su calidad. La automatización de los laboratorios desempeña en este sentido un papel primordial, sobre todo cuando se determinan trazas de analitos en muestras biológicas complejas.

Todos los métodos analíticos de aminos se basan en sus características estructurales específicas y tienen que elaborarse sobre la base de que normalmente esta especificidad es limitada y solamente se produce en circunstancias muy concretas, por lo que los procedimientos tienen que estar perfectamente estipulados para obtener resultados de la mejor calidad analítica.

Después de cuatro décadas de analizar casi exclusivamente un pequeño número de aminos importantes farmacológica y fisiológicamente, el interés se dirige ahora hacia otras aminos de origen biológico cuya significancia fisiológica es menos aparente o está peor establecida. El término aminos biógenas recupera, de esta manera, el sentido literal originalmente utilizado por Guggenheim en su libro *Die Biogenen Aminen* [30], dándose un paso más en el establecimiento de métodos analíticos generales para las aminos biógenas.

El interés por determinar aminos biógenas de forma individualizada se debe a que no todas tienen la misma importancia, dado que la acción toxicológica de unas y otras es diferente, así como las propiedades organolépticas que se derivan de su presencia en los alimentos. Además, participan de diferente manera en los procesos fermentativos implicados en la elaboración de algunos de estos alimentos, destacando particularmente los que se producen

durante la vinificación. Así por ejemplo, la fenetilamina, la 2-metilbutilamina y la isoamilamina, pueden desaparecer durante este proceso [31, 32], mientras que otras como la histamina y la putrescina, pueden incrementar sus niveles naturales.

La mayor parte de los procedimientos de análisis de aminas biógenas en alimentos son adaptaciones de métodos aplicados inicialmente a la determinación de aminas y/o aminoácidos en investigaciones médicas [33]. Se marcan de esta manera las pautas a seguir en análisis más generalizados, lo cual es interesante aunque complejo si concurren en estos análisis aminoácidos interferentes.

A pesar de estas limitaciones, las técnicas existentes son suficientemente versátiles para adaptarlas a un problema analítico concreto. Los métodos actuales han mejorado sustancialmente en los últimos años, aplicando procedimientos cromatográficos no generalizables pero fácilmente adaptables.

En general, los métodos de determinación de aminas biógenas se inician con un proceso de separación, normalmente precedido por una etapa de acondicionamiento de la muestra, al que sigue un proceso de detección condicionado habitualmente por una reacción previa de derivatización que asegura la selectividad del análisis y aumenta su sensibilidad.

Todas las muestras de origen biológico implican una problemática diferente dependiendo de su complejidad y de la concentración de aminas. No es posible, utilizando un solo método, establecer un perfil de todas las que serán importantes en la muestra problema.

Puesto que nuestro interés se centra en el análisis de vinos, obviaremos aquellos tratamientos relacionados con otros tipos de muestras alimentarias.

No obstante, los procedimientos que se describirán, puesto que están basados en la estructura química de las aminas, podrían generalizarse a otros tipos de muestras acuosas. No hay que olvidar que el vino, en su definición más burda, es una solución hidroalcohólica de una concentración entre el 10 y el 14%.

Resulta difícilmente esquematizable el proceso general de determinación de aminas biógenas, dado que cada procedimiento de *clean up*, separación y detección está condicionado por el momento en el que se efectúa (si se efectúa) la reacción de derivatización. Las condiciones de derivatización y las características de los derivatizantes empleados en la determinación de aminas biógenas, incluyendo las propiedades del producto de reacción obtenido y si el proceso se realiza antes o después de la separación cromatográfica, condicionarán tanto el tipo de *clean-up* de la muestra como la técnica de concentración de las aminas minoritarias. Estas afirmaciones llevan implícita una relación íntimamente ligada entre todos los procesos, por lo que resulta difícil explicar uno de ellos sin conocer todos los demás. Prueba de ello es la diversidad de planteamientos que en este sentido se encuentran en la bibliografía. El criterio que se ha tomado en la redacción de este apartado de la introducción es el que se ha considerado más lógico, aunque cualquier otro habría sido igualmente justificable.

El elemento común en la mayor parte de los métodos de determinación de aminas biógenas es el uso de algún agente derivatizante que normalmente se aplica después de efectuarse la etapa de *clean up* de la muestra. Por este motivo, se ha considerado procedente describir en primer lugar los procesos más habituales de tratamiento de la muestra, lo cual no excluye que estos mismos procesos puedan emplearse sobre muestras ya derivatizadas (en este sentido la derivatización podría considerarse también un proceso de *clean up*). Se describen a continuación, de forma muy breve, las técnicas de

análisis empleadas en la determinación de aminas biógenas en vinos, introduciéndose las técnicas de derivatización aplicadas a los análisis realizados por cromatografía líquida de alta resolución, ya que ésta ha sido la técnica de separación en que se ha basado el trabajo experimental desarrollado en esta tesis. Los derivatizantes empleados para las determinaciones realizadas mediante otras técnicas se indican junto a la descripción de las mismas.

Finalmente, y dado que la detección de los analitos está siempre condicionada por la derivatización aplicada, se describen aquellos sistemas que son habitualmente utilizados en el análisis de aminas biógenas por cromatografía líquida de alta resolución.

Todos los métodos de análisis de aminas biógenas por *HPLC* que se han aplicado a su determinación en vinos, se han recogido en un artículo aceptado para su publicación el próximo mes de junio en el *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. Dicho artículo, cuya copia se reproduce al final del capítulo, se hace eco de todos los sistemas analíticos aplicados recientemente a este tipo de determinaciones, por lo que nos remitimos a él para profundizar en los conceptos que, de forma general, veremos a continuación.

3.1. TÉCNICAS APLICADAS AL TRATAMIENTO (*CLEAN UP*) DE MUESTRAS ENOLÓGICAS

Todas las etapas de *clean up* se basan en que las estructuras químicas de los analitos deben ser lo más homogéneas posible y suficientemente diferentes de las sustancias interferentes en la posterior determinación analítica. Basándose en esta estructura se consiguen fraccionamientos de la muestra que mejoran sustancialmente la selectividad del método. En el caso de que

este fraccionamiento permita además la concentración de los analitos, se rebajarán también sus límites de detección.

La extracción líquido-líquido [34], combinada con una destilación cuando la determinación se realiza por GC [20] y más recientemente la extracción en fase sólida [35], han sido las técnicas de *clean up* más empleadas a este respecto, siendo aplicadas tanto sobre las aminos como sobre sus diferentes derivados, con el fin primordial de reducir la interferencia de aminoácidos y polifenoles, compuestos mayoritariamente presentes en los vinos.

3.1.1. Filtración

El tratamiento de muestra más sencillo y más respetuoso con la estructura de las aminos consiste en una simple filtración, suficiente si se determinan contenidos de aminos mayoritarias y se dispone de sistemas de separación y detección adecuados.

Si, por el contrario, se analizan contenidos de aminos minoritarias o si la técnica de detección no es lo suficientemente sensible, será necesario recurrir a procesos de extracción/concentración de la muestra previos a su análisis.

3.1.2. Extracción líquido-líquido (LLE)

Respecto a las técnicas de LLE, los extractantes más empleados han sido el butanol [34, 36-38], el acetato de etilo [39-41], el éter etílico [20, 34, 36, 42] y el diclorometano [38].

Todos estos métodos, útiles por la sencillez del utillaje implicado, se caracterizan por un tratamiento de muestra relativamente largo, emplean grandes volúmenes de solventes orgánicos y presentan porcentajes de

recuperación de las aminas muy variables en función de sus estructuras y de la forma química en que se encuentren en la muestra.

Así, las sales y las bases libres de muchas de las aminas naturales son solubles en agua. La homogeneización con ácidos resulta efectiva para su extracción y posterior destilación, pero es difícil concentrar grandes volúmenes de estas soluciones sin perder las aminas que se encuentran a niveles de trazas, dado que las de menor peso molecular son volátiles. Si se trabaja en medio alcalino, realizando extracciones con acetato de etilo, éter dietílico, butanol y otros solventes de similares características, se descomponen algunas aminas (como la putrescina) dada su inestabilidad en soluciones alcalinas [30]. De acuerdo con nuestra experiencia, una extracción líquida con estos disolventes del vino alcalinizado no produce el efecto deseado de eliminación de polifenoles sin pérdidas apreciables de los analitos (datos no publicados).

3.1.3. Cromatografía iónica en columna (IEX)

La cromatografía iónica en columna se ha utilizado con éxito durante los últimos 40 años en el *clean up* de las muestras, empleando intercambiadores iónicos para la separación de aminas y aminoácidos, aplicándose un gran número de resinas y eluyentes a diferentes pH y fuerzas iónicas y utilizando diferentes métodos de detección (normalmente colorimétricos) a las fracciones recogidas.

La tediosidad de estos procedimientos ha obligado a la investigación de procesos más automatizables facilitados, por otro lado, por el uso de pequeñas columnas cromatográficas. El desarrollo de estos mecanismos automáticos inicialmente aplicados y perfeccionados para el análisis de

aminoácidos, sugirió la utilización de los mismos mecanismos para el análisis de aminas.

3.1.4. Extracción en fase sólida (SPE)

Las técnicas de extracción en fase sólida han experimentado un gran desarrollo en los últimos años. Las columnas de extracción en fase sólida emplean las interacciones selectivas que pueden darse entre los analitos y la fase estacionaria normalmente de sílice químicamente modificada. Los adsorbentes están enlazados covalentemente con grupos funcionales que confieren a las fases estacionarias un rango de aplicación que va desde el apolar hasta el polar pasando por los intercambiadores iónicos fuertes y débiles. Todos estos adsorbentes muestran capacidades muy elevadas de retención de los analitos con lo cual se consiguen aislamientos muy selectivos que permiten efectuar un *clean up* de la muestra, en muchas ocasiones simultáneo al proceso de concentración de analitos. Se consigue, de una manera relativamente simple, influir positivamente sobre la selectividad y los límites de detección de los métodos de análisis.

Existen tres mecanismos principales de extracción en fase sólida: apolar, polar e intercambio iónico. Los adsorbentes incluidos en cada categoría muestran buenas propiedades de retención y selectividad. La selección del mejor adsorbente se hace en función de las características de analito y matriz y siempre teniendo presente el objetivo del análisis.

El proceso normal pasa por la dilucidación de las estructuras químicas que tienen los analitos, es decir, si tienen grupos apolares (radicales alquílicos o aromáticos), polares (hidroxilos, aminas) y/o iónicos (aminas, carboxílicos), para poder influir en una retención selectiva. Al igual que en los procedimientos basados en la extracción líquido-líquido o en la

cromatografía iónica, otros factores a considerar serán la solubilidad y las posibles ionizaciones que puedan sufrir.

Respecto a la matriz, ésta determinará frecuentemente el tipo de extracción que tendrá que utilizarse. Si la muestra es acuosa, los analitos con grupos funcionales apolares o iónicos pueden extraerse mediante adsorbentes apolares o iónicos, respectivamente. Si la matriz es no acuosa, deben extraerse los analitos con grupos polares con adsorbentes polares.

También, al igual que en otros procedimientos de extracción, hay que tener en cuenta aquellos componentes que pueden interferir en el proceso. Por ejemplo, cuando se trata de una matriz con fuerza iónica elevada ($>0.1M$) ésta interferirá en el intercambio iónico de un analito. La dilución de la matriz con agua o un tampón de menor fuerza iónica puede evitar estas interferencias. Si la matriz contiene otros compuestos que pueden interferir en el posterior análisis, hay que diseñar un proceso propio basado en las diferencias de solubilidad, pK_a o polaridad de los grupos funcionales que existan entre el analito y las interferencias.

Finalmente, respecto al objetivo, solamente se trata de definir el tipo de técnica analítica que se utilizará en la determinación. El análisis final dictará el tipo de eluyente a emplear. Si se utiliza cromatografía líquida de alta resolución, la fase móvil empleada en el sistema cromatográfico suele utilizarse como eluyente. Si se utiliza cromatografía de gases, el eluyente debe ser no acuoso y, por supuesto, volátil. Si el volumen de eluyente es inferior al volumen inicial de la muestra y tiene suficiente fuerza elutrópica, se consigue concentrar los analitos al tiempo que se efectúa el *clean up*.

Las experiencias realizadas previamente para aislar aminas mediante la cromatografía de intercambio iónico, nos proporciona una pista sobre la

viabilidad de adsorbentes intercambiadores catiónicos débiles formados por grupos carboxílicos [24, 37, 43-45], los intercambiadores catiónicos fuertes constituidos por grupos sulfónicos [37, 46-48] y los de octadecilsilano (C_{18}) [49-52] para la pre-separación de mezclas biológicas complejas, y la posterior determinación de las aminas en fracciones utilizando métodos específicos.

3.1.5. Otros tratamientos

Finalmente, otro factor que es imprescindible tener presente cuando se realiza el *clean up* de muestras enológicas es la interferencia específica que aportan las sustancias polifenólicas. Para su eliminación se utiliza normalmente la polivinilpirrolidona (PVP) [50, 53, 54], aunque también se han ensayado otros procedimientos como la SPE realizada con cartuchos intercambiadores aniónicos (SAX) previa neutralización de las aminas [51, 52] o, para muestras simples, con cartuchos de octadecilsilano [46, 51, 52].

3.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A LA DETERMINACIÓN DE AMINAS EN VINOS

Existe una gran variedad de técnicas propuestas para el análisis de aminas biógenas. La fluorimetría, la cromatografía de capa fina, la cromatografía de gases, la espectrometría de masas, la cromatografía en analizadores de aminoácidos y la cromatografía líquida de alta resolución han sido, entre otras, técnicas que se han aplicado en diferentes momentos a esta determinación.

A pesar de lo que pudiera parecer por el gran número de métodos desarrollados en los últimos años, no existe un método rápido y simple para la determinación de aminas biógenas, aunque la cromatografía líquida de alta resolución ofrece buenas posibilidades en este sentido.

Generalmente los procedimientos se basan en la separación y cuantificación de derivados de las aminas, obtenidos mediante reacción con agentes fluorogénicos como la fluorescamina, el cloruro de dansilo y el *o*-ftaldialdehído, de los que hablaremos más adelante.

La cromatografía de intercambio iónico mediante el uso de analizadores de aminoácidos también se ha utilizado con cierta frecuencia en la determinación de aminas biógenas.

3.2.1. Técnicas no cromatográficas

Los métodos más utilizados durante las dos últimas décadas en el análisis de aminas biógenas han sido los espectrofotométricos y, más concretamente, los espectrofluorimétricos.

Son métodos de sensibilidad elevada, aunque solamente pueden emplearse en la determinación de aminas que dan reacciones cromogénicas o fluorogénicas específicas. Exceptuando algunos trabajos [55, 56], suelen ser aplicados al análisis de un número restringido de aminas, normalmente histamina y/o tiramina.

Estos métodos precisan de un tratamiento previo de la muestra que normalmente consiste en una cromatografía de intercambio iónico [24, 45, 55-58] o una extracción líquido-líquido [22, 40, 59].

La detección se realiza después de producirse la derivatización de las aminas con reactivos, como la ninhidrina [55, 56, 58], el α -nitroso- β -naftol [40] y el *o*-ftaldialdehído [24, 34, 45, 57, 59], que inducen en ellas coloración o fluorescencia.

3.2.2. Cromatografía de capa fina (TLC)

Paralelamente a estos métodos, se han desarrollado otros que permiten identificar y cuantificar las aminas mediante cromatografía de capa fina. Los métodos basados en esta técnica son rápidos y económicos y muy válidos para hacer determinaciones cualitativas. Sin embargo, las cuantificaciones son difíciles de realizar si se carece de una instrumentación especial. Por otra parte, la elevada complejidad de la matriz implica la necesidad de realizar tratamientos de muestra largos que incluyen normalmente una cromatografía de intercambio iónico y/o una extracción líquido-líquido anteriores a la separación. La detección se realiza espectrofotométricamente previa derivatización con ninhidrina [34, 42, 44, 60], espectrofluorimétricamente previa derivatización con o-ftaldialdehído [57] o α -nitroso- β -naftol [40], o bien por espectrometría de masas previa derivatización con cloruro de dansilo [61].

3.2.3. Cromatografía de gases (GC)

Por su parte, la cromatografía de gases ha sido utilizada durante mucho tiempo para solucionar los problemas planteados por las técnicas anteriores. Sus métodos implican, no obstante, tratamientos de muestra largos que suelen incluir un proceso de destilación previo a la derivatización de las aminas, normalmente con anhídrido trifluoroacético, para convertirlas en compuestos volátiles y una posterior extracción líquido-líquido. El detector más usual ha sido el fotométrico de llama, aunque algunos trabajos emplean el de llama alcalina y el espectrómetro de masas.

En general, todos estos métodos que implican largos tratamientos de muestra y dificultad de automatización, han quedado en cierta manera relegados a un segundo plano a pesar de ser métodos suficientemente

sensibles. Sus aportaciones han sido importantes porque han permitido conocer los mecanismos de actuación de las aminas biógenas en distintos medios y frente a diferentes derivatizantes.

3.2.4. Cromatografía de intercambio iónico (IEC)

El análisis de aminas biógenas con analizadores automáticos de aminoácidos basados en procesos de derivatización postcolumna es un método adecuado para su determinación en medios biológicos. Los componentes del equipo de cromatografía líquida de alta resolución pueden utilizarse sin ninguna modificación o, dicho de otra manera, un equipo de gradiente puede sustituir al analizador automático de aminoácidos.

Los tiempos de análisis son del orden de 3-6 veces mayor que en el caso de las separaciones convencionales realizadas por cromatografía líquida de alta resolución (separación de OPA-derivados).

No existe ninguna dificultad en detectar aminas secundarias cuando se emplean los derivatizantes como la ninhidrina. Sería posible mejorar los tiempos de análisis y la sensibilidad de la detección optimizando los intercambiadores iónicos, del detector visible y las condiciones de reacción (optimización de la cámara de mezcla y del reactor) y utilizando microcolumnas [62].

3.2.5. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución ha solventado muchos de los problemas planteados por los métodos anteriormente descritos, entre los cuales cabe destacar la limitación del número de analitos (fluorimetrías), la

excesiva manipulación de la muestra (*TLC, GC*) o el elevado tiempo de análisis (*IEC*).

La *HPLC* ha experimentado un gran avance en los últimos años ligado a la facilidad de automatización de los instrumentos que emplea. En muchos casos, se ha implantado como técnica oficial de análisis de aminas biógenas en laboratorios alimentarios [63].

Todos los métodos que emplean la *HPLC* para determinar el contenido de aminas biógenas quedan encuadrados en el grupo de los métodos de inyección directa o en los que emplean reacciones de derivatización pre o postcolumna para mejorar su sensibilidad.

La inyección directa

Cuando se analizan aminas por el método de inyección directa de la muestra, la separación puede realizarse por cromatografía iónica [41] o por cromatografía de pares iónicos en fase inversa (*IPR-RP-HPLC*) [64, 65].

La cromatografía iónica se beneficia del carácter iónico de las aminas al pH ácido natural del vino, por lo que no es necesario un tratamiento adicional de la muestra. La detección se realiza habitualmente por absorbancia UV. Exceptuando el trabajo realizado por Baucom y col. en 1986 [41] con un cromatógrafo iónico diseñado para el análisis de aminoácidos, no se ha aplicado al análisis de vinos concretamente.

La cromatografía de pares iónicos, por su parte, se realiza añadiendo los reactivos cromogénicos formadores de pares iónicos a la fase móvil. Al igual que en el caso anterior, tiene la ventaja de requerir una reducida manipulación de la muestra. La detección se realiza por absorbancia UV a diferentes longitudes de onda [61].

Los procedimientos descritos, no obstante, son de difícil aplicación a vinos ya que presentan inconvenientes como las bajas concentraciones en que se encuentran las aminas biógenas y la región del espectro en la que se trabaja, muy baja para considerarla selectiva, sobre todo en muestras reales. Los límites de detección (*LODs*), por tanto, no son suficientemente bajos, ya que las aminas no presentan un coeficiente de absortividad molar elevado en la región del UV-Vis. Para aumentar estos *LODs* se emplean los métodos de derivatización de la muestra, ya sea antes o después de la separación cromatográfica. De esta manera se desplaza la región espectral de detección hacia longitudes de onda más altas o bien se recurre a la fluorescencia.

La derivatización

El problema de la derivatización de las aminas biógenas está concentrado en la selectividad y la sensibilidad de su detección. Las cantidades de muestra disponible son muy pequeñas, por lo que la reacción de derivatización tiene que permitir trabajar en el rango de los picomoles (en adelante, pmol). La concentración de aminas biógenas en el vino y otras sustancias puede llegar a niveles de concentración de ppb.

La derivatización puede darse antes de la separación. Normalmente se realiza de forma automática inmediatamente antes de ella. Tiene que producirse cuantitativamente, dando lugar a un solo producto de cada amina, sin interferencia del reactivo. Puesto que la derivatización homogeniza los analitos, existirán problemas de selectividad en el proceso de separación cromatográfica, que tendrán que tenerse en cuenta.

La derivatización después de la separación requiere en general mayor complejidad instrumental y lleva asociada una mayor duración del análisis cromatográfico, siendo necesaria la adición de reactivos formadores de par

iónico que neutralicen la carga de los amino compuestos. Los equipos comerciales tiene que ser optimizados para poder conseguir sensibilidades elevadas en la detección.

En la tabla II.2 se indican las ventajas e inconvenientes más frecuentes de los métodos de derivatización pre- y postcolumna más empleados hace una decena de años. Aunque algunas de estas indicaciones que allí se hacen siguen siendo vigentes, muchas de ellas han cambiado, principalmente las ligadas a la automatización de los equipos, posible tanto en procesos de derivatización precolumna como en los de derivatización postcolumna, como veremos seguidamente.

Cuando se realizan derivatizaciones *off-line*, la instrumentación requerida en un sistema de derivatización precolumna es la que se requiere en un sistema

Derivatización precolumna	Derivatización postcolumna
Ventajas	
Método simple Sistema cromatográfico inalterado Tiempo de reacción intrascendental Libre elección de las condiciones de reacción	Método <i>on-line</i> continuo Fácilmente automatizable Separación del analito en su forma original Exceso de reactivo no influyente en separación Tiempo de análisis menor. Sin pérdidas. Preparación de la muestra La reacción no tiene que ser completa Mejor reproducibilidad Posibilidad de detectores en serie
Inconvenientes	
Muestras generalmente menos homogéneas La reacción debe ser cuantitativa Posibilidad de interferencias en la separación: - reactivo - medio de reacción - formación de artefactos - varios derivados de un solo compuesto	Complejidad instrumental Ensanchamiento adicional de picos en reactor No elección libre del eluyente El reactivo y los subproductos de reacción no tiene que interferir en la detección

Tabla II.2. Derivatización pre y postcolumna [62]

normal de *HPLC*, por lo que los métodos pueden considerarse simples y relativamente económicos. Si, por el contrario, se trata de realizar una derivatización *on-line*, es imprescindible disponer de un sistema de inyección automático, lo que se traduce en un coste adicional del equipo que sobrepasa el de un sistema tradicional de derivatización postcolumna. Para este último se precisa, como mínimo, una bomba de *HPLC* adicional, además de la cámara de mezcla y el reactor, lo cual sitúa su coste entre el de la derivatización precolumna convencional y el de la automática. La reproducibilidad de los dos métodos automáticos es elevada.

Cuando se trata de reacciones de derivatización de cinética rápida, son aconsejables las técnicas *on-line*, tanto las realizadas precolumna como las postcolumna. Si la cinética que gobierna la reacción es lenta, solamente podrán aplicarse derivatizaciones precolumna realizadas *off-line*, lo cual permite la preconcentración de los derivados, si es necesaria.

En la derivatización postcolumna la separación y la reacción de detección son inequívocas, pero el tiempo requerido para la separación puede ser superior que el necesario en un sistema de derivatización precolumna. Sin embargo, el tiempo total de análisis puede resultar menor en un proceso de derivatización postcolumna, dependiendo del derivatizante empleado.

En los métodos de derivatización postcolumna la separación de las aminas se realiza por cromatografía de pares iónicos (fase inversa) [64, 66], lo cual provoca un desgaste adicional de las columnas analíticas, o por cromatografía de intercambio iónico. La derivatización se realiza con ninhidrina [55, 56, 58] y la detección por absorbancia UV-Vis, aunque es más habitual la derivatización con *o*-ftaldialdehído [24, 45, 57] seguida de una fluorimetría.

Entre las ventajas de estos procedimientos cabe destacar que el tiempo que transcurre entre la derivatización y la detección es muy corto, factor importante cuando se trabaja con derivados inestables como es el caso del *o*-ftaldialdehído. Además el proceso es fácilmente automatizable, aunque puede resultar un método caro debido a las modificaciones que tienen que realizarse en el equipo instrumental para llevar a cabo la reacción de derivatización.

Uno de los inconvenientes más destacables de este proceso es que los picos de los aminoácidos también aparecen en el cromatograma, aunque puede evitarse su interferencia modificando la polaridad de la fase móvil. En efecto, un aumento de su polaridad retrasa la elución de los derivados de las aminas ya que son menos polares que los derivados de los aminoácidos (que eluirán al principio del cromatograma). Este proceso, no obstante, implica alargar el tiempo de cromatograma y, por consiguiente, el tiempo de análisis.

La *HPLC* en fase inversa solventa los dos problemas fundamentales descritos para la *HPLC* postcolumna. Los derivados formados contienen al menos un anillo aromático en su estructura, hecho que disminuye su polaridad y permite una mejor separación, ya que ésta se lleva a cabo generalmente en régimen de gradiente. En este caso, la reacción de derivatización no es imprescindible realizarla en el mismo cromatógrafo y, por tanto, no se requiere una modificación instrumental.

El hecho de disponer de fases químicamente ligadas posibilita el hecho de que pueda trabajarse con diferentes tipos de fases estacionarias sobre un mismo soporte, existiendo en el caso de la separación de aminas biógenas columnas de C_8 y C_{18} , siendo estas últimas las preferidas dada su gran estabilidad.

La elección de la fase móvil es otro de los parámetros importantes en la separación cromatográfica. Aunque existe la posibilidad de trabajar en régimen isocrático [55, 67], en la mayoría de los trabajos la separación se realiza mediante un gradiente de polaridad.

Las fases móviles son en general mezclas binarias de metanol o acetonitrilo y una solución acuosa tamponada. El pH de la fase móvil predominante en todos estos estudios es ligeramente básico, lo que presenta el inconveniente de limitar la vida media de las columnas de base sílice. La utilización de columnas de base polimérica permite soslayar este inconveniente [52].

Al igual que en otras técnicas, se escogerá el sistema de detección que proporcione la mayor sensibilidad. En el caso de la determinación de aminos biógenos por *HPLC* los detectores más habituales son el de absorbancia UV-Vis y, sobre todo, el de fluorescencia. El uso de uno u otro será función del derivado formado tras el proceso de derivatización.

Los derivatizantes

Aparte de la detección mediante los detectores no específicos de ionización de llama empleados en cromatografía de gases, en todos los métodos normalmente empleados en el análisis de aminos primarias y secundarias, se utiliza el grupo amino para formar derivados adecuados para una determinación sensible y/o una mejor separación. Mientras que la sensibilidad de la detección depende de la reacción de derivatización, la especificidad está limitada solamente por la calidad del proceso de separación. En la práctica, casi todas las reacciones de detección pueden combinarse con todos los procedimientos de separación.

La obtención de derivados fluorescentes es el método más utilizado ya que permite la determinación de aminas a bajas concentraciones con una gran sensibilidad y selectividad.

Los reactivos adecuados para el análisis de pequeñas cantidades de aminas tienen que proporcionar una reacción cuantitativa en condiciones no muy estrictas y en medio acuoso, mostrando especificidad por grupos primarios y/o secundarios. Además deben proporcionar una elevada sensibilidad en la detección, dando lugar a derivados poco polares que puedan concentrarse en un proceso de *clean up* pudiendo cromatografiarse posteriormente de forma fácil.

Existen numerosos compuestos que reaccionan tanto con grupos amino primarios como con primarios y secundarios. No se conoce, hasta el momento, un reactivo que sea específico de grupos amino secundarios, ni tampoco un reactivo capaz de proporcionar reacciones cuantitativas con aminas terciarias.

Los mayoría de los grupos reactivos pueden utilizarse tanto en las reacciones de derivatización fluorogénicas como en las cromogénicas. La especificidad de la reacción y la formación de productos laterales durante la formación del derivado son en principio las mismas para los derivados coloreados que para los fluorescentes. La ventaja obvia de la fluorescencia es su mayor sensibilidad de detección. Otra ventaja es el amplio rango de linealidad entre la cantidad de sustancia y la intensidad de la fluorescencia, lo cual simplifica y mejora la evaluación *in situ* de los compuestos cromatografiados y detectados en continuo.

En la figura II.3 se muestran las estructuras de los reactivos derivatizantes más empleados en el análisis de aminas biógenas en vinos.

Algunos de ellos, como la ninhidrina, reaccionan con aminas primarias y secundarias en soluciones débilmente ácidas con altos rendimientos en la reacción, dando derivados estables que pueden extraerse del medio de reacción y son adecuados para una posterior separación cromatográfica seguida de una detección espectrofotométrica o fluorimétrica. La restricción de la sensibilidad de la detección hasta niveles de nanomoles (en adelante, nmol) es la mayor limitación de los métodos de derivatización con ninhidrina.

El PITC [35, 41], el DnsCl [11, 38, 43, 67] y la FLURAM [55, 67] rebajan los límites de detección a niveles de pmol, el primero por detección UV y los siguientes por fluorescencia, aunque es posible utilizarlos también en una detección absorciométrica UV.

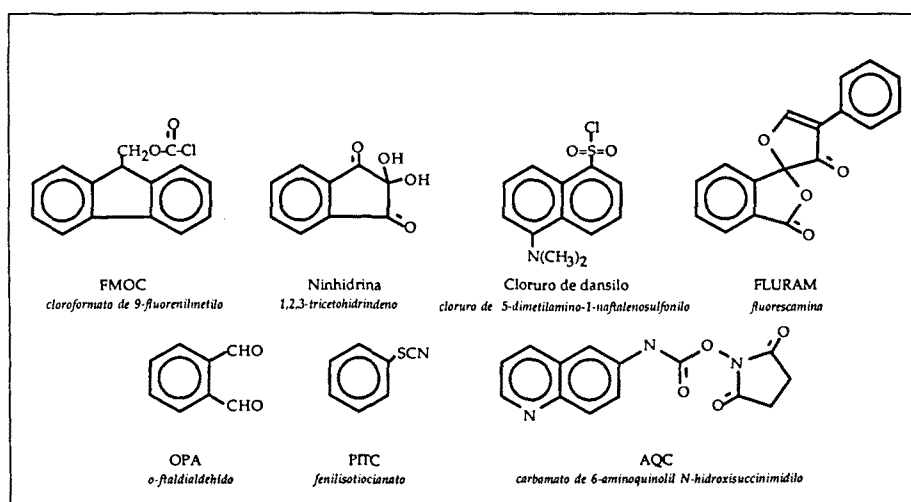


Figura II.3. Derivatizantes utilizados para la determinación de aminas biógenas en vinos

El FMOC, el AQC y el OPA proporcionan derivados cuya detección por fluorescencia llega a niveles de femtomoles (en adelante, fmol). De todos ellos, el último es el más utilizado por su gran sensibilidad y rapidez de reacción, a pesar de la limitada estabilidad de sus derivados.

El uso de los reactivos cromogénicos y fluorogénicos sigue siempre una de estas estrategias básicas: se deja que los derivados se formen y se aplica la técnica de separación sobre ellos, o bien un grupo de compuestos de características semejantes se pre-separa por *LLE* o *SPE*, aplicándose la reacción de detección sobre los compuestos fraccionados, normalmente previa eliminación de los subproductos de reacción no deseables.

A pesar de que los reactivos que han alcanzado mayor aceptación han sido el DnsCl y el OPA, existen otros que también han dado buenos resultados en análisis concretos de vinos. Todos ellos se comentan seguidamente. No entramos ahora en la discusión pormenorizada de las características de aquellos reactivos empleados en el desarrollo de la tesis por considerar más conveniente discutirlos en los respectivos capítulos.

El fenilisocianato y el PITC reacciona con aminas primarias y secundarias en soluciones alcalinas con altos rendimientos en la reacción, proporcionando derivados estables de urea y tiourea, respectivamente, que se detectan por absorbancia UV. Los más utilizados son los segundos, dado que los primeros reaccionan también con agua y alcoholes dando uretanos. Dependiendo de las condiciones de reacción pueden obtenerse varios subproductos de reacción. Las condiciones de derivatización son estrictas y precisan de la presencia de un disolvente orgánico para producir la reacción de ciclación que da lugar al derivado. Este método resulta difícilmente automatizable dado que el proceso es largo y, por tanto, tampoco se puede emplear como reactivo derivatizante postcolumna. El inconveniente más

destacable, no obstante, reside en el hecho de que la detección se realiza empleando un detector de absorbancia UV-Vis, lo cual comporta un problema de interferencia de matriz importante dado que trabajamos con muestras muy complejas.

La restricción de la sensibilidad de la detección y su dificultad de automatización son, pues, las mayores limitaciones de los métodos de derivatización con PITC, aunque presenta las ventajas de proporcionar derivados estables y de no requerir una instrumentación especial.

El DnsCl proporciona derivados muy estables de aminas primarias y secundarias. Tiene el inconveniente de dar lugar a cromatogramas complejos dado que no proporciona un solo producto de reacción y, además, reacciona con fenoles, alcoholes alifáticos y algunos azúcares [68].

La FLURAM derivatiza compuestos que contienen grupos funcionales nucleófilos (aminas primarias y secundarias, alcoholes, agua, etc.), aunque regulando convenientemente el pH del medio de reacción puede hacerlo de forma exclusiva con aminas primarias. Si se derivatizan poliaminas, proporciona múltiples productos de reacción. Los derivados gozan de una estabilidad semejante a los obtenidos con el PITC, pero se obtienen de forma más rápida y más automatizable.

El FMOC reacciona de forma rápida con aminas primarias y secundarias aunque no proporciona un único producto de reacción. La estabilidad de sus derivados es excelente.

El AQC por su parte, reacciona con grupos amino primarios y secundarios siguiendo una cinética de reacción rápida. La estabilidad de los derivados es excelente. Su inconveniente principal es que da lugar a picos de exceso de reactivo que pueden llegar a interferir en el cromatograma [69].

Finalmente, el OPA reacciona instantáneamente con grupos amino primarios proporcionando derivados cuya inestabilidad condiciona los procedimientos de separación y detección en los que esté implicado. Es el más utilizado por su bajo coste, su elevada sensibilidad, su rapidez de reacción y la facilidad de automatización del proceso analítico tanto si la derivatización se realiza *pre-, post- u on-column*.

Existe asimismo la posibilidad de determinar aminas biógenas primarias y secundarias de forma automatizada mediante derivatización precolumnaa combinando OPA (derivatiza las primarias) y FMOC (derivatiza las secundarias). La detección se puede realizar tanto por absorbancia UV como por fluorescencia dependiendo de la sensibilidad requerida. En el caso de emplear un detector UV, éste tiene que ser un detector de diodos integrados ya que las aminas biógenas primarias se detectan a 338 nm y las secundarias a 266 nm. Las longitudes de onda de excitación y de emisión, en el caso de emplear un detector de fluorescencia, también son diferentes para las aminas biógenas primarias y secundarias.

Este método, a pesar de que presenta ventajas respecto al método OPA, comporta el inconveniente de que hay que disponer de un detector de diodos integrados y de una automatización del sistema de derivatización y de inyección de la muestra.

La detección

Hemos visto que los métodos de detección más usuales en el análisis de aminas biógenas son la espectrofotometría UV-Vis ($\lambda_{\text{aprox}} 250 \text{ nm}$) y la fluorimetría. Esta última debido a su mayor especificidad y sensibilidad ha sido mucho más utilizada tanto en la detección directa de aminas biógenas como en la de sus derivados químicos [70]. Las longitudes de onda de

excitación y emisión más empleadas en la detección de los dansil-derivados son 360 y 460 nm, respectivamente, mientras que para los OPA-derivados son habituales las de 350 y 445 nm.

Otros detectores, como el electroquímico [33, 71, 72] y el conductimétrico [73] han sido utilizados para el análisis de aminos en muestras acuosas de diferentes orígenes aunque, hasta el momento, aún no se han aplicado a vinos.

Se puede decir, a modo de resumen, que entre las diferentes técnicas analíticas utilizadas para la determinación de aminos biógenos en vinos, la *HPLC* se ha impuesto sobre las demás [70], debido al destacado papel que desempeña en la determinación simultánea de un gran número de aminos de forma rápida y relativamente simple. No obstante, la perspectiva desde la que debe abordarse el problema de la determinación por *HPLC* de las aminos biógenos en vinos, debe establecerse siempre en base a su nivel de concentración y, obviamente, a la disponibilidad instrumental del laboratorio donde vaya a realizarse el análisis.

Seguidamente se incluye, en su formato original, el artículo de revisión bibliográfica que se publicará próximamente en la revista *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. En él se recogen los procedimientos analíticos que se han aplicado al análisis de aminos biógenos en vinos durante los últimos 25 años.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. L.M.L. Nollet. *Food Analysis by HPLC*. Marcel Dekker, Inc. New York (1992)
- [2]. L. Nykänen y H. Suomalainen. *Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages*. D. Reidel Publih. Co. Dordrecht (1983)
- [3]. J.C. Cabanis. *Bull OIV* 656-657: 1009 (1985)
- [4]. J. Lüthi y C. Schlatter. *Z Lebensm Unters Forsch* 177:439 (1983)
- [5]. D.W. Lowenberg, C.S. Ough, S. Lepkorsky y F.F. Furuta. *Am J Enol Vitic* 32:128 (1981)
- [6]. T. Bauza, J.P. Bali, A. Blaise, M.L. Souli y J.C. Cabanis. *FV OIV* 931 (1992)
- [7]. G.Ch. Yen y T. Chandra. *J Sci Food Agric* 44:273 (1988)
- [8]. H. Suomalainen, L. Nykänen y K. Eriksson. *Am J Enol Vitic* 25:179 (1974)
- [9]. M.C. de la Torre. *El Campo* 130:73. Ed. BBV. Bilbao (1994)
- [10]. J.P. Chaytor, B. Crathorne y M.J. Saxby. *J Sci Food Agric* 26:593 (1975)
- [11]. R. Battaglia y D. Frölich. *J High Resol Chr & Chr Comm* 2:100 (1978)
- [12]. *Bull OIV* 705-706:808 (1989)
- [13]. WHO. *International Digest of Health Legislation* 42:692 (1991)
- [14]. WHO. *International Digest of Health Legislation* 43:325 (1992)
- [15]. WHO. *International Digest of Health Legislation* 44:467 (1993)
- [16]. M.C. Ingargiola. *Étude du carbamate d'éthyle dans les vins*. Ph D. Burdeos (1992)
- [17]. M. Henry. *Ann Fals Exp Chem* 24 (1960)
- [18]. J. Stratton, T. Hutkins y S. Taylor. *J Food Protection* 54:460 (1991)
- [19]. M.T. Veciana, T. Hernández, A. Mariné y M.C. Vidal. *J Assoc Off Anal Chem Internat* 78:1045 (1995)
- [20]. C.S. Ough y C.E. Daudt. *Am J Enol Vitic* 32:185 (1981)
- [21]. J. Aerny. *FV OIV* 881 (1990)
- [22]. M.C. Ulla, M.C. Vidal y A. Mariné. *Rev Agroquím Tecnol Alim* 29:221 (1989)
- [23]. C. Buteau, C.L. Duitschaever y G.C. Ashton. *Am J Enol Vitic* 35:228 (1984)
- [24]. S. Lafon-Lafourcade. *Connaiss Vigne Vin* 9:103, 1975
- [25]. K.P. Faeth y F. Radler. *Wein-Wiss* 49:11 (1994)
- [26]. R.E. Simard, J.A. Zee, R. Goulet y J. Tremblay. *Sci Aliment* 2:I (1982)
- [27]. T. Bauza, A. Blaise, P.L. Teissedre, J.P. Mestres, F. Daumas y J.C. Cabanis. *Sci Aliment* 15:559 (1995)
- [28]. S.A. Krieger. *Wine Industry Journal* Feb:56 (1993)
- [29]. M.C. Vidal, R. Codony y A. Mariné. *Am J Enol Vitic* 42:145 (1991)
- [30]. N. Seiler. *J Chromatogr* 143: 221 (1977)
- [31]. P. Schereier. *CRC Crit Rev Sci Nutr* 12:59 (1979)

- [32]. G. Montedoro y M. Bertuccioli. *Developments of Food Science*. Elsevier Sci Publ. pp 171-238 (1986)
- [33]. B. Washington, M. Smith, T. Robinson, J. Oluwadewo y R. Ochillo. *J Liq Chromatogr* 14:2189 (1991)
- [34]. K. Mayer y G. Pause. *FV OIV* 449 (1973)
- [35]. M. Calull, R.M. Marcé, J. Fábregas y F. Borrull. *Chromatographia* 31:133 (1991)
- [36]. G. Pause y K. Mayer. *Wein-Wiss* 27:174 (1972)
- [37]. G. Cerutti. *FV OIV* 562 (1975)
- [38]. P. Lehtonen. *Z Lebensm Untersch Forsch* 194:177 (1986)
- [39]. C. Buteau, C.L. Duitschaever y G.C. Ashton. *J Chromatogr* 212:23 (1981)
- [40]. J.C. Rivas, P. Pindado y A. Mariné. *Rev Agroquím Tecnol Aliment* 22:133 (1982)
- [41]. T.L. Baucom, M.H. Tabacchi, T.H. Cottrell y B.A. Richmon. *J Food Sci* 51:1376 (1986)
- [42]. A. Vecchio, C. Finoli, G. Cerutti y F. Moedler. *Vigne vini* 16:57 (1989)
- [43]. A. Ibe, K. Saito, M. Nakazato, Y. Kikuchi, F. Fujinuma y T. Nishima. *J Assoc Off Anal Chem* 74:695 (1991)
- [44]. R. Zappavigna, E. Brambati y G. Cerutti. *Riv Vitic Enol* 27:285 (1974)
- [45]. B. Plumas y C. Sautier. *FV OIV* 442 (1973)
- [46]. P. Pfeiffer y F. Radler. *Am J Enol Vitic* 43: 315 (1992)
- [47]. O. Busto, M. Mestres, J. Guasch y F. Borrull. *Chromatographia* 40:404 (1995)
- [48]. O. Busto, M. Miracle, J. Guasch y F. Borrull. *J Liq Chromatogr*, en prensa
- [49]. R.E. Subden, R.G. Brown y A.C. Noble. *J Chromatogr* 166:310 (1978)
- [50]. O. Busto, Y. Valero, J. Guasch y F. Borrull. *Chromatographia* 38:571 (1994)
- [51]. O. Busto, J. Guasch y F. Borrull. *J Chromatogr* 718:309 (1995)
- [52]. O. Busto, M. Miracle, J. Guasch y F. Borrull. *J Chromatogr*, pendiente de aceptación
- [53]. K. Mayer y G. Pause. *FV OIV* 781 (1984)
- [54]. K. Mayer y G. Pause. *Lebensm Wiss u Technol* 17:177 (1984)
- [55]. D.L. Ingles, J.F. Back, D. Gallimore, R. Tindale y J.L. Shaw. *J Sci Food Agric* 36:402 (1985)
- [56]. N. Sayem, R. Simard, L. L'Heureux y A. Roberge. *J Chromatogr* 256:313 (1983)
- [57]. C. Tejedor y A. Mariné. *Rev Agroquím Tecnol Aliment* 19/2:261 (1979)
- [58]. H. Woidich, W. Pfannhauserr, G. Blaicher y U. Pechanek. *Mitt Klosterneuburg* 30:27 (1980)
- [59]. M.C. Vidal, A. Ambatlle, M.C. Ulla y A. Mariné. *Am J Enol Vitic* 41:160 (1990)
- [60]. E. Puputti y H. Suomalainen. *Mittlungen* 19:184 (1969)
- [61]. F. Addeo y A. Malorni. *Sci Tecnol Aliment* IV:241 (1974)

- [62]. H. Engelhardt. *Practice of High Performance Liquid Chromatography*. pp 410-425
Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York (1986)
- [63]. U. Feier y P.H. Goetsch. *Arch Lebensmittelhyg* 44:134 (1993)
- [64]. M.H.L.J. Joosten y C. Olieman. *J Chromatogr* 356:311 (1986)
- [65]. M.C. Gennaro y C. Abrigo. *Chromatographia* 31:381 (1991)
- [66]. M. Izquierdo, M. Vidal y A. Mariné. *J Assoc Off Anal Chem Internat* 76:1027 (1993)
- [67]. C. Buteau, C.L. Duitschaever y G.C. Ashton. *J Chromatogr* 284:201 (1984)
- [68]. T. Bartók, G. Börösök y F. Sági. *J Liq Chromatogr* 15:777 (1992)
- [69]. O. Busto, J. Guasch y F. Borrull. *J Chromatogr*, en prensa
- [70]. W.J. Hurst. *J Liq Chromatogr* 13:1 (1990)
- [71]. A.M. Wheatley y K.F. Tipton. *J Food Biochem* 11:133 (1987)
- [72]. Z. Yi y P.R. Brown. *J Liq Chromatogr* 13:2161 (1990)
- [73]. M.C. Gennaro y E. Marengo. *Chromatographia* 25:603 (1988)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

JOURNAL INTERNATIONAL DES SCIENCES DE LA VIGNE ET DU VIN

J Internat Sci Vigne Vin, 2 (1996) 1-17

BIOGENIC AMINES IN WINE: A REVIEW OF ANALYTICAL METHODS

O. Busto^a, J. Guasch^a and F. Borrull^b

^aDepartament de Química, Escola d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Avda. Ramón y Cajal, 70
43005 Tarragona, Spain

^bDepartament de Química, Facultat de Química, Universitat Rovira i Virgili, Pça. Imperial Tàrraco, 1
43005 Tarragona, Spain

Manuscrit reçu le 11 mars 1996
Accepté pour publication le 1^{er} avril 1996

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

BIOGENIC AMINES IN WINE: A REVIEW OF ANALYTICAL METHODS

ABSTRACT

The content of biogenic amines in wines and other fermented beverages has been extensively studied over the last 25 years because of the physiological effects which their consumption might lead to, in particular in the presence of alcohol. From the health point of view, this may indicate that the hygienic conditions while the beverage in question was being produced were deficient.

Thanks to the rapid evolution of analytical techniques, there is now a better knowledge of the origin and the content of biogenic amines in wines. At present, data about concentrations are sufficiently reliable for rules to be established about the maximum recommendable limits in each country, although as yet there are no legal, unified regulations.

The most widely used analytical methods for determining biogenic amines nowadays are based on chromatographic separation procedures and, in particular, on High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

This study reviews research which has compiled data about the presence of biogenic amines in wines and about the analytical techniques used to determine them, putting special emphasis on HPLC methods and the sampling treatments necessary to carry out the analyses.

1. INTRODUCTION

There are a great deal of substances which are physiologically active in the human metabolism and which are incorporated into it by the ingestion of food of an animal or vegetable origin. These substances usually have a positive effect on the physiological mechanism of organisms, although if the quantity ingested is quite high, they may have a harmful effect, above all on the nervous system.

The content of biogenic amines in food may be related to the quality of the raw material and to the technological process to which it has been subjected (Karmas, 1981; Bertrand and Delas, 1992; Krieger, 1993). In most cases, the content shows how well conserved the food is. The content of biogenic amines in food of animal origin is not very significative (Henry, 1960). Most of the biogenic amines which have any scientific interest are present in food of a vegetal origin.

Biogenic amines characteristically appear in fermented food. The activity of microbes on the proteins in the food, both in the ripening or fermenting process as well as in the possible process of decomposition, is the main cause of these biogenic amines. This activity initiates the sequence in which the proteolytic reactions lead to the precursor aminoacids, the decarboxylation of which results in the formation of the respective amines (Vidal, 1987).

Of all the amines present in food, histamine is the one which has been studied most, although since the end of the 60's ethanolamine, putrescine, cadaverine, tyramine, methylamine and butylamine have also been the object of scientific studies, the main aim of which has been to determine their content in different food types such as olives (Hornero and Garrido, 1994), cheese (Mentasti *et al.*, 1991; Moret *et al.*, 1992), fish (Takatsuki and Kikuchi, 1990; Giorgio *et al.*, 1993), meat (Shalaby, 1993; Straub *et al.*, 1993; Eerola *et al.*, 1993) and fermented beverages (Herráiz *et al.*, 1975; Yamamoto *et al.*, 1980; Cerutti *et al.*, 1987b), among which wine and all its varieties and production stages stands out. Subsequently, phenethylamine, amylamine, ethylamine, tryptamine, propylamine and hexylamine have been incorporated as amines which are present more sporadically.

Interest in the presence of biogenic amines in food increased after 1946 when they were diagnosed as possibly being toxic. So, they have been the object of

several bibliographic reviews focussed on different food such as chocolate, (Hurst *et al.*, 1982; Joosten and Olieman, 1986), lactic products (Sieber and Lavanchy, 1990; Stratton *et al.*, 1991), meat (Schmitt *et al.*, 1988), seafood (Gill, 1990; Horner, 1992) or food in general (Lovenberg, 1974; Smith and Palumbo, 1981; Ingles *et al.*, 1985; Hurst, 1990; Halasz *et al.*, 1994). However, few of these revisions focus on the specific analysis of wine (Frölich and Battaglia, 1980; Silva and Colagrande, 1987) and it is particularly noteworthy that only histamine, and in some cases tyramine, have been worthy of any special attention.

2. REGULATIONS

In general, it can be said that biogenic amines have toxic effects and may affect blood pressure. Cabanis, in an excellent study published in 1985, reviewed the origin and physiological and toxicological properties of histamine. Phenethylamine and tyramine are considered to be hypertensive amines. The latter also affects the absorption into the blood of histamine (Bauza *et al.*, 1992) which, unlike the other two, is hypotensive (Yen and Chandra, 1988). Putrescine and cadaverine may change into pyrrolidine and piperidine, by heat, which may react with nitrites in acidic conditions and form carcinogenic compounds such as nitropyrrolidine and nitropiperidine. As well as these effects, there is the possibility that some of the biogenic amines found in wines (serotonin among them) may be involved in alcohol addiction (Suomalainen *et al.*, 1974) which can increase the effect of these amines (Chaytor *et al.*, 1975). Migraines have been related with the consumption of half a litre of wine with histamine concentrations higher than 5mg/l (Battaglia and Frölich, 1978).

The presence of biogenic amines in wines has also been associated to bacterial contamination during the production process (Buteau *et al.*, 1984b) and so there is considerable interest in histamine, and other amines, as indicators of defective production from a hygienic point of view (Jakob, 1969). In this respect, it is considered that a wine produced in correct hygienic conditions should be practically amine-free (Cerutti and Remondi, 1972).

For these reasons, some countries have established regulations and legal requirements about the limits for biogenic amine content, mainly histamine, in several foods (Table 1), although there is no unified criterium about the maximum limit allowed to be sold or consumed (Lehtonen *et al.*, 1992).

Country	Food	LMR	Reference
Germany	Wine	2 mg/l	(Millies and Zimlich, 1988)
			(Lehtonen, 1992)
	Fish	200 mg/kg	(WHO, 1991)
Switzerland	Wine	10 mg/l	(OIV, 1989)
		4 mg/l	(Lehtonen, 1992)
	Fish	10 mg/100 g	(Vidal, 1987)
Belgium	Wine	5-6 mg/l	(Millies and Zimlich, 1988)
			(Lehtonen, 1992)
France	Wine	8 mg/l	(Millies and Zimlich, 1988)
			(Lehtonen, 1992)
USA	Tuna	10 mg/100 g	(Stratton <i>et al.</i> , 1991)
	Food	50 mg/100 g	(Wills <i>et al.</i> , 1987)
Sweden	Fish	200 mg/kg	(WHO, 1992)
Finland	Fish	10 mg/100 g	(Vidal, 1987)
Czechoslovakia	Wine	5 mg/l	(García <i>et al.</i> , 1994)
Canada	Fish	10 mg/100 g	(Vidal, 1987)
Denmark	Fish	10 mg/100 g	(Vidal, 1987)
	Tuna and bonito	20 mg/100 g	(Vidal, 1987)
Austria	Fish	200 mg/kg	(WHO, 1993)
Holland	Wine	10 mg/l	(García <i>et al.</i> , 1994)
EU	Wine	3.5 mg/l	(OIV, 1989, 1991a)
	Fish	200 mg/kg	(Giorgio <i>et al.</i> , 1993)

Table 1. Maximum recommendable limits (MRL) of histamine in food

Actually, the only country to pronounce on the maximum admissible limit of biogenic amines has been U.S.A., which has set the value, for tuna, at 20mg/100g of fish, only taking into account histamine levels, although this value is reduced to 10mg/100g when there are traces of decomposition (Stratton *et al.*, 1991). For the rest of food, only Swiss legislation sets a value for histamine concentration above which products for human consumption can be rejected, although for seaproducts, Finland, Sweden and Austria have also passed restrictive laws (WHO, 1991-1993).

The lack of legislation about the content of biogenic amines which can be found in food in general and wines in particular, makes it difficult to correctly judge the imports and exports of these products (Ingargiola, 1992). So, Holland rejects wines which contain more than 3.5mg/l of histamine and checks for the presence of other biogenic amines, while Switzerland accepts all those that do not have more than 10mg/l of histamine and gives no importance to other biogenic amines which they regard as being minorities (OIV, 1989, 1991a).

3. AMINES IN WINES

Interest in the presence of biogenic amines in wines and their possible effect on quality was made quite clear by the preferential treatment which the subject was given by the Agreement Sub-Commission for the Unification of Analysis Methods and Appreciation of Wines of the *Office International de la Vigne et du Vin* (OIV). In particular, the histamine content of wines was discussed in length between 1983 and 1985 (OIV, 1983-1985) and, since 1989, the subject has been dealt with in all the annual meetings (OIV, 1989-1994).

There is great controversy about the origin of amines in wines largely because they seem to appear at random. In many studies carried out amines are formed in some wines, while in others of similar characteristics they do not appear. Obviously, there is a factor which is not exactly known or certain conditions which cause them to appear.

There is not much information available about the presence of amines in musts, although it is known that concentrations of histamine are rarely above 10mg/l (Lafon-Lafourcade, 1975; Desser *et al.*, 1981; Aerny, 1985, 1990) and that there are traces of others, such as tyramine and ethanolamine (Buteau *et al.*, 1984b). These concentration levels are very low when compared to the ones found in wines so we can conclude that amines are formed in the fermenting stages.

During alcoholic fermentation, the only amine which is formed in substantial concentrations is ethanolamine, which may reach values of up to 20mg/l by the end, together with small quantities of histamine, tyramine, cadaverine and putrescine (Desser *et al.*, 1981; Buteau *et al.*, 1984b; Aerny, 1990). Studies carried out using different yeasts have reached the conclusion that during alcoholic fermentation, histamine is not formed in any appreciable quantity (Lafon-Lafourcade, 1975), not even in musts which are rich in histidine, its natural precursor. Therefore, it can be concluded that this does not appear to be the origin of most of the amines found in wines.

In general, it is accepted that histamine is produced mainly by bacterial activity during malolactic fermentation (Aerny, 1990; Colagrande, 1992; Krieger, 1993; Faeth and Radler, 1994), although how it is formed and the conditions in which it is generated have yet to be fully clarified. This point has been particularly controversial and various authors have pointed out that the concentration of histamine during malolactic fermentation actually

decreases (Lafon-Lafourcade, 1975; Buteau, 1984b). Bacteria of the species *Pediococcus cerevisae* seem to be mainly responsible for the formation of histamine (Aerny, 1990). Unlike the species *Leuconostoc oenos*, these bacteria can develop at pHs over 3.3 and in the presence of sulphur dioxide, so at the end of the fermentation they may decarboxylate the aminoacids.

The pH and the content of sulphur dioxide only affect the bacterial flora which will guide the malolactic fermentation. So, to minimise the formation of histamine and other amines it is recommended (Aerny, 1990) that wines of pHs below 3.3 should be obtained before malolactic fermentation and that sulphur dioxide should only be added in quantities lower than 50mg/l of must and with not at all after alcoholic fermentation. So, malolactic fermentation will be driven by *Leuconostoc oenos* and histamine and the other amines will only be minimally formed.

Red wines have higher concentrations of amines than white wines (Schneyder, 1973; Cilliers and Van Wyk, 1985). This may be due to the greater development of bacteria during malolactic fermentation (Aerny, 1985), which may give rise to greater decarboxylasic activity and more biogenic amines. Another cause may be the use of bentonite, which is normally used in the clarification of white wines and which at doses of over 50g/hl decreases the content of biogenic amines. Finally, it has been proposed that yeast, the extracts of which are rich in nitrogenated compounds, should be autolysed as a source of amines during the vinification of red wines since these are not normally clarified before malolactic fermentation.

Histamine was the first biogenic amine to be found in wine by Tarantola in 1954 (Cabanis, 1985). Amine content in wines was first systematically determined mainly between the beginning of the 60s (Marquardt *et al.*, 1963)

and the beginning of the 70s (Puputti and Suomalainen, 1969; Ough, 1971; Zappavigna and Cerutti, 1973). The studies carried out by Mayer (1974) on the content of histamine in Swiss wines and by Cilliers and Van Wyk (1985) on the content of histamine and tyramine in South African wines are of special interest. Subsequently, these studies were extended to research other biogenic amines. Nowadays, the presence of biogenic amines in wine is beyond question, so much so that it is mentioned in many general reviews about the constituents of wine (Schreier, 1979; Nykänen and Suomalainen, 1983; Montedoro and Bertuccioli, 1986; Ough and Amerine, 1988).

Tables 2 and 3 summarize the data about the principal biogenic amine average contents in white and red wines from different countries. Those references (Zee *et al.*, 1983; Lehtonen *et al.*, 1992) which indicate the concentration ranges of some of the amines are not included. As well as the amines included in the previous tables, the following have also been detected, although rarely and only in low concentrations: agmatine, spermine, spermidine, octapamine, dimethylamine, propylamine, pyrrolidine, diethylamine, amylamine, butylamine, morpholine, tryptamine, iso-butylamine and hexylamine. The studies published by Frölich and Battaglia (1980), Pfannhauser and Pechanek (1984) and Lehtonen (1986) are worthy of special mention because they include data about more than twenty biogenic amines in wines.

The study of biogenic amines in Spanish wines also began in the 70s with research into histamine (Martín, 1975; Tejedor and Mariné, 1978, 1979; Burdaspal, 1979; Iñigo and Bravo, 1980; Bravo *et al.*, 1983; Vidal and Mariné, 1985; Calull *et al.*, 1991) which then was subsequently extended to other amines among which was tyramine (Rivas *et al.*, 1982-1983; Vidal *et al.*, 1990, 1991). More recently, the content of biogenic amines has been studied more generally and all those that are regarded as being of major (García *et al.*,

1994; Busto *et al.*, 1994; Iñiguez and Vázquez, 1994) and minor presence (Busto *et al.*, 1994-1995, 1996a) have been included.

Country	MET	HIS	IPR	TIR	ETA	CAD	PUT	FEN	ETY	IAM	Reference
France	0.8										Lafon-Lafourcade, 1975
	4.9										Schneyder, 1973
	0.1			0.1	0.1				0.5	1.0	Puputti and Suomalainen, 1969
				0.8		0.2	1.8	1.1		1.0	Lehtonen <i>et al.</i> , 1992
	0.1		0.5		2.8		0.4	0.3	0.4	1.0	Lehtonen, 1986
Japan	4.4			6.5		1.4	2.3				Zee <i>et al.</i> , 1983
	0.1	1.1		1.0		0.1	1.2	2.3	0.3	5.1	Ibe <i>et al.</i> , 1991
Australia	ND			0.1		0	0.1	0.1			Ingles <i>et al.</i> , 1985
Austria	0.5			0.5		0.8	0.9	0.7			Woidich <i>et al.</i> , 1980
	0.5			0.5		0.8	0.9	0.7			Pfannhauser and Pechanek, 1984
Italy					6.1						Margueri <i>et al.</i> , 1983
				0.7		0.1	1.8	0.2		0.2	Lehtonen <i>et al.</i> , 1992
	0.9			1.4		0.1	1.0				Zee <i>et al.</i> , 1983
Switzerland	0.1		0.2		2.1		0.6	0.2	0.4	0.8	Lehtonen, 1986
	12	1.0	2.0	20				13.0	0.5	20.0	Mayer and Pause, 1984a
Canada			3.0			0.5	4.8	1.0			Walther <i>et al.</i> , 1987
	1.9						1.2				Zee <i>et al.</i> , 1983
Portugal	1.1			4.4		1.4	2.4				Zee <i>et al.</i> , 1983
Spain	2.6			4.7							Vidal <i>et al.</i> , 1991
	2.1										Tejedor and Mariné, 1979
	2.1			1.3			1.9				Zee <i>et al.</i> , 1983
	0.5	0.5			0.7		0.6		0.1		Busto <i>et al.</i> , 1994
	0.5	1.2	0.1	ND	0.1	ND	3.0	ND	ND	0.5	Busto <i>et al.</i> , 1996a (*)
USA	0.8	0.3		<0.4		<0.2	2.0	0.8	0.8		Iñiguez and Vázquez, 1994
				2.5							Rivas <i>et al.</i> , 1982
	3.5			0.1		37.3	2.7				Baucom <i>et al.</i> , 1986
	1.1			0.3		17.6	2.4				Baucom <i>et al.</i> , 1986
	2.4			0.1		29.4	2.7				Baucom <i>et al.</i> , 1986
Germany	3.6			3.2			1.7				Zee <i>et al.</i> , 1983
	0.1				3.2		0.4	1.2	0.3	6.3	Lehtonen, 1986
				2.8			2.0	2.7		3.7	Lehtonen <i>et al.</i> , 1992
	3.7			5.9		1.3	1.3				Zee <i>et al.</i> , 1983
Hungary	0.1		0.2		2.5		1.8	0.7	0.1	3.6	Lehtonen, 1986

Table 2. Content of biogenic amines (mg/l) in white wines. MET: methylamine; HIS: histamine; IPR: isopropylamine; TIR: tyramine; ETA: ethanolamine; CAD: cadaverine; PUT: putrescine; FEN: phenethylamine; ETY: ethylamine; IAM: isoamylamine
 ND = not detected; (*) Median

Country	MET	HIS	IPR	TIR	ETA	CAD	PUT	FEN	ETY	IAM	Reference
France		2.2									Lafon-Lafourcade, 1975
		6.5									Schneyder, 1973
		1.1		5.4		2.3	3.6	1.0			Woidich <i>et al.</i> , 1980
	0.1		0.2		2.1		1.7	0.4	0.4	0.1	Lehtonen, 1986
	0.1	3.6		3.2		0.2	10.8	0.9	0.9		Tricard and Cabazeil, 1990
	0.1	1.2		0.7		0.3	4.8	0.2	0.5	0.2	Tricard and Cabazeil, 1991
		0.4		1.0	0.4		0.4		1.2	2.5	Puputti and Suomalainen, 1969
Switzerland		8.1		7.3		1.0	7.6				Zee <i>et al.</i> , 1983
		5	2		5		1			1	Mayer and Pause, 1984a
		28		8	17	0	9	8		3	Walther <i>et al.</i> , 1987
Japan	0.2	1.9		1.9		0.2	4.8	1.3	0.8	2.0	Ibe <i>et al.</i> , 1991
Austria		3.3		1.7		0.7	7.6	0.9			Woidich <i>et al.</i> , 1980
		3.1		1.5		0.8	7.3	1.4			Pfannhauser and Pechanek, 1984
Hungary		4.9		0.1		1.3	16.2	0.1			Woidich <i>et al.</i> , 1980
		6.6									Mack, 1973
Italy	0.2		0.2		5.4		2.2	2.2	1.2	0.7	Lehtonen, 1986
		0.1		0.1		0.1	0.9	0.1			Woidich <i>et al.</i> , 1980
	0.2	2.2		3.2		0.2	6.4	1.0	1.3		Tricard and Cabazeil, 1990
	0.1		0.3		4.1		1.0	0.4	1.1	0.1	Lehtonen, 1986
		0.3									Mack, 1973
Spain		4.1		4.0		0.5	3.1				Zee <i>et al.</i> , 1983
		5.6									Tejedor and Mariné, 1979
	<0.4	4.7		3.4		0.5	7.8	0.6	1.2		Iñiguez and Vázquez, 1994
	0.3	5.0		6.3		0.2	16.6	0.9	2.0		Tricard and Cabazeil, 1990
	0.1	0.8	0.3		6.3	0.2	13.0	0.8	1.5	5.9	Lehtonen, 1986
		1.9		1.2							Vidal <i>et al.</i> , 1991
		3.9	0.3	2.2			4.6	1.2	0.7	2.8	Busto <i>et al.</i> , 1995a
		8.9		4.2							Vidal <i>et al.</i> , 1991
	0.1	1.1			1.9	0.3	9.0		0.9		Busto <i>et al.</i> , 1994
		7.6		5.2							Vidal <i>et al.</i> , 1991
				2.4							Rivas <i>et al.</i> , 1982
Portugal	0.7	5.1	ND	ND	2.1	ND	3.8	ND	0.7	0.2	Busto <i>et al.</i> , 1996a (*)
	0.8	6.3		ND		0.6	4.4	0.6	0.5	0.1	Busto <i>et al.</i> , 1996b (*)
		1.2					0.9				Zee <i>et al.</i> , 1983
Yugoslavia	0.1	1.1	0.3		2.5		3.0	0.8	0.9	4.6	Lehtonen, 1986
USA		15.1		6.3		1.1	35.8	1.1		1.0	Lehtonen <i>et al.</i> , 1992
		5.6		ND		21.8	1.1				Baucom <i>et al.</i> , 1986
		3.3		ND		19.5	2.6				Baucom <i>et al.</i> , 1986
		2.0		ND		17.5	2.6				Baucom <i>et al.</i> , 1986
		1.0									Ough, 1971
		7.3		8.6		0.8	5.5				Zee <i>et al.</i> , 1983
		3.7		4.3		0.3	2.2				Zee <i>et al.</i> , 1983
Germany		2.1									Mack, 1973
Algeria		6.6		8.2		0.2	16.0			0.1	Lehtonen <i>et al.</i> , 1992
North Africa		1.0									Mack, 1973
Australia		1.4		2.4		0.1	6.7			0.1	Lehtonen <i>et al.</i> , 1992
Bulgaria		2.9		5.5		0.1	6.6	2.6		4.7	Lehtonen <i>et al.</i> , 1992

Table 3. Content of biogenic amines (mg/l) in red wines. MET: methylamine; HIS: histamine; IPR: isopropylamine; TIR: tyramine; ETA: ethanolamine; CAD: cadaverine; PUT: putrescine; FEN: phenethylamine; ETY: ethylamine; IAM: isoamylamine
 ND = not detected; (*) Median

4. ANALYSIS OF BIOGENIC AMINES IN WINES

The two most pressing problems faced by the quality control of food in general, and of wine in particular, are usually the complexity of the sample matrix and the low concentration levels which have to be determined. Both variables mean that new systems are continually being developed with the aim of achieving greater accuracy, sensitivity and specificity of the analytical methods.

There are a great deal of methods developed for determining biogenic amines in food. Although at first, as has been mentioned above, specific methods for analysing a single amine (normally histamine or tyramine) were developed, as both extractive and chromatographic separation techniques have been perfected, the number of analytical methods which can simultaneously determine several amines has gradually increased. At present HPLC is the most used technique because of its great versatility, and is in fact the technique used in the reference methods of official analysis laboratories (Feier and Goetsch, 1993).

Table 4 summarizes the methods used to determine biogenic amines in wines which use techniques other than HPLC. Initially, the most usual methods for these determinations used techniques such as spectrofluorimetry (Santos *et al.*, 1985; Vidal, 1987; Vidal *et al.*, 1989) which give the total value of the biogenic amine content in the sample to be analyzed and are often preceded by a derivatization method.

More recently, thin-layer chromatography (TLC) (Cerutti *et al.*, 1987a), column ionic chromatography (Ingles *et al.*, 1985), gas chromatography (GC) and basically HPLC have enabled biogenic amines to be determined individually working with different eluents and mobile phases. Capillary

electrophoresis (Ma *et al.*, 1992) and mass spectrometry (MS) (Burlingame, 1982) have also been used in the analysis of biogenic amines, although they have not been specifically applied to wine.

Technique	N	Derivatizing reagent	D	Clean-up	Reference
Spectrometry	1	o-phthalaldehyde	FL	IEC (*)	Lafon-Lafourcade, 1974
	1	o-phthalaldehyde	FL	IEC (*)	Lafon-Lafourcade, 1975
	1	o-phthalaldehyde	FL	IEC (*)	Plumas and Sautier, 1973
	1	o-phthalaldehyde	FL	IEC (*)	Tejedor and Mariné, 1979
	1	o-phthalaldehyde	FL	LLE (*)	Vidal <i>et al.</i> , 1989-1991
	1	o-phthalaldehyde	UV	E (*)	Mayer and Pause, 1973a
	5	Ninhydrin	Visible	IEC (*)	Ingles <i>et al.</i> , 1985
	10	Ninhydrin	Visible	IEC (*)	Sayem-el Daher <i>et al.</i> , 1983
	6	Ninhydrin	Visible	IEC (*)	Woidich <i>et al.</i> , 1980
	1	α -nitroso- β -naphthol	FL	LLE (*)	Vidal <i>et al.</i> , 1990-1991
	1	α -nitroso- β -naphthol	FL	LLE (*)	Rivas <i>et al.</i> , 1979, 1982
	1	α -nitroso- β -naphthol	FL	LLE (*)	Ulla <i>et al.</i> , 1989
TLC	5	-	-	-	Cerutti <i>et al.</i> , 1987a
	2	Ninhydrin/Pauly	-	LLE (*) - IEC (*)	Zappavigna <i>et al.</i> , 1974
	4	Ninhydrin	-	-	Puputti & Suomalainen, 1969
	9	Ninhydrin	Visible	LLE (*)	Mayer and Pause, 1973b
	5	Ninhydrin	Visible	IEC (*)	Cerutti <i>et al.</i> , 1986
					Vecchio <i>et al.</i> , 1989
	1	Ninhydrin	Visible	LLE (*) - IEC (*)	Cerutti, 1975
	19	Dansyl chloride	MS	LLE (*) / IEC (*)	Addeo and Malorni, 1974
	1	α -nitroso- β -naphthol	FL	LLE (*)	Rivas <i>et al.</i> , 1979, 1982
	1	o-phthalaldehyde	FL	IEC (*)	Tejedor and Mariné, 1979
GC	10	Trifluoroacetic anhyd.	NPD	DST (*) - LLE (**)	Daudt and Ough, 1980
	10	Trifluoroacetic anhyd.	MS	DST (*) - LLE (**)	Ough <i>et al.</i> , 1981
	2	Trifluoroacetic anhyd.	MS	DST (*) / LLE (*)	Almy <i>et al.</i> , 1983
				LLE (**)	
	8	Trifluoroacetic anhyd.	MS	DST (*) - LLE (**)	Ough and Daudt, 1981
MS	4	-	FID	DST - LLE - IEC	Puputti & Suomalainen, 1969
	8	Dansyl chloride		LLE (**)	Walther <i>et al.</i> , 1987

Table 4. Generally applicable analytical methods of biogenic amines in wines

Detection (D): FL = fluorescence; UV = ultraviolet; MS = Mass Spectrometry; FID = flameionization detector
 NPD = nitrogen/phosphorus detector

Clean-up: IEC = ion exchange chromatography; LLE = liquid-liquid extraction; DST = distillation;
 E = electrophoresis; (*) pre-derivatization; (**) post-derivatization

N = number of biogenic amines analysed

Practically all the analytical techniques mentioned have an associated pre- or post- chromatographic treatment to improve the selectivity and the sensitivity of the different methods. However, it is not always necessary to resort to these treatments because the sample can be directly injected as long as there is a suitable detection system, both in GC and in HPLC (Seiler, 1977).

Most of the analytical methods of biogenic amines are based on derivatization reactions which improve the two quality parameters mentioned. These reactions can be carried out either pre- or post- column, which often conditions the concentration techniques which are applied during the analysis of minority amines.

So, trifluoroacetic anhydride (TFA) is normally used in gas chromatography, while dansyl chloride (DnsCl) or *o*-phthaldialdehyde (OPA) are normally used in liquid chromatography, the latter being particularly sensitive and quick at reacting, despite the limited stability of its derivatives.

Other occasionally used derivatizing reagents are phenylisothiocyanate (PITC) (Calull *et al.*, 1991) and 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (FMOC) (Pfeiffer and Radler, 1992), both utilised in liquid chromatography. More recently, 6-aminoquinolinol-n-hydroxysuccinimidyl-carbamate (AQC) (Busto *et al.*, 1996a-b), commercialized as AccQ.TagTM, has been used and its high sensitivity gives more stable derivatives than the ones from the reaction with the traditional OPA.

5. ANALYZING BIOGENIC AMINES IN WINES USING HPLC

Biogenic amines are normally analysed by ionic chromatography or by reverse phase chromatography. In the first case, the ionic character of the amines at an acidic pH is used. In the second, the amines are normally derivatised previously, although the chromatographic separation can also be carried out using reagents which form ionic pairs with the amines, followed by a post-column derivatisation.

Prior to the chromatographic separation, it is usual to *clean up* the samples to eliminate any interference. This *clean-up* may also be used to simultaneously concentrate the amines and by so doing there are considerable improvements in the sensitivity of the methods applied.

Liquid-liquid and, more recently, solid-phase extraction have been the most used techniques in this respect and are applied to the sample itself as well as its derivatization products. If the aim is to determine contents of principal amines in wine as is the case of histamine, tyramine, putrescine, cadaverine and/or phenethylamine, a filtration prior to sample injection is usually sufficient. If contents of minority amines are to be determined or if the detection technique is not sensitive enough, there will have to be processes of sample extraction/concentration prior to the analysis.

Table 5 summarizes the different methods found in the bibliography of analysing biogenic amines using HPLC and gives the derivatizing reagents, the chromatographic conditions and the detection systems used.

In general, the limits of detection (LOD) of the HPLC techniques are not significantly different from the ones obtained using the techniques in Table 4, the lowest values being about 5µg/l (Pereira and Bertrand, 1994) and the highest about 500µg/l (Aerny, 1982; Iñiguez and Vázquez, 1994). However,

N	SP	Mobile phase (MP)	DR.	Det	Clean-up	Reference
4	C ₁₈	salicylate/phosphate	-	UV	-	Gennaro and Abrigo, 1991
19	C ₁₈	ACN-water	DnsCl (1)	UV	PVP (*) - SPE (**)	Busto <i>et al.</i> , 1994
1	SSW	cyclohexane-AcEt	DnsCl (1)	FL	-	Aerny, 1982
16	C ₈ /C ₁₈	ACN-water	DnsCl (1)	FL	IEC (*) - LLE (**)	Ibe <i>et al.</i> , 1991
10	C ₁₈	HAc/ACN-MeOH/ACN	DnsCl (1)	FL	LLE (**)	Buteau <i>et al.</i> , 1984a
1	SSW	cyclohexane-AcEt	DnsCl (1)	FL	LLE (**)	Battaglia and Frölich, 1978
26	C ₁₈	ACN- ACN/EtOH	DnsCl (1)	UV-FL	LLE (*) - LLE (**)	Lehtonen, 1986
7	C ₁₈	ACN/MeOH/HAc/water	DnsCl (1)	UV	LLE (**)	Vecchio <i>et al.</i> , 1989
8	C ₁₈	phosphate-OctOH/ACN	OPA (1)	FL	-	Tricard <i>et al.</i> , 1991
1	C ₁₈	ACN/phosphate	OPA (1)	UV	SPE (*)	Subden <i>et al.</i> , 1978
7	C ₁₈	NaAc/THF-MeOH	OPA (1)	FL	-	Droz and Tanner, 1983
7	C ₁₈	phosphate-OctOH/ACN	OPA (1)	FL	-	Tricard and Cabazeil, 1990
7	C ₁₈	MeOH/THF/NaAc-NaAc	OPA (1)	FL	-	Iñiguez and Vázquez, 1994
7	#	#	OPA (1)	FL	-	Ingargiola and Bertrand, 1991
10	C ₁₈	HAc/ACN-MeOH/ACN	OPA (1)	FL	LLE (**)	Buteau <i>et al.</i> , 1984a
7	C ₁₈	HAc/ACN-MeOH/ACN	OPA (1)	FL	LLE (**)	Buteau <i>et al.</i> , 1984b
17	C ₁₈	NaAc/THF-MeOH	OPA (1)	FL	PVPP (*)	Mayer and Pause, 1984a-b
6	C ₁₈	HAc-ACN	OPA (1)	FL	-	Lehtonen <i>et al.</i> , 1992
8	C ₁₈	phosphate-OctOH/ACN	OPA (1)	FL	-	Pereira and Bertrand, 1994
16	C ₁₈	THF/TEA-MeOH	OPA (1)	FL	SPE (*)	Busto <i>et al.</i> , 1995a
15	C ₁₈	THF/NaAc-MeOH	OPA (1)	FL	SPE-PI (*)	Busto <i>et al.</i> , 1995b
8	C ₁₈	OPA/Borate- ACN	OPA (2)	FL	SPE	Busto <i>et al.</i> , 1996c
1	C ₁₈	NaAc/ HAc - ACN	PITC (1)	UV	SPE (**)	Calull <i>et al.</i> , 1991
3	Pico Tag Waters™ System		PITC (1)	FL	LLE	Baucom <i>et al.</i> , 1986
10	C ₁₈	HAc/ACN-MeOH/ACN	FLURAM (1)	FL	-	Buteau <i>et al.</i> , 1984a
5	C ₁₈	-	FLURAM (1)	FL	IEC (*)	Ingles <i>et al.</i> , 1985
16	C ₁₈	THF/NaAc-MeOH	AQC (1)	FL	-	Busto <i>et al.</i> , 1996b
16	C ₁₈	THF/NaAc-MeOH	AQC (1)	FL	SPE (*)	Busto <i>et al.</i> , 1996c
4	C ₁₈	Ninhydrin/DMSO	-	UV	TCA (*)	Joosten and Olieman, 1986
1	C ₈	NaAc/ACN-NaAc/ACN	FMOC (1)	FL	SPE (*) - LLE (**)	Pfeiffer and Radler, 1992

Table 5. HPLC analytical methods for determining biogenic amines in wines

Mobile phase: HAc = acetic acid; NaAc = sodium acetate; ACN = acetonitrile; MeOH = methanol; EtOH = ethanol; THF = tetrahydrofuran; OctOH = octanol; TEA = triethanolamine; AcEt = ethyl acetate; DMSO = dimetil sulfoxide; #: not indicated. The hyphens indicate binary systems

Detection (Det): FL = fluorescence; UV = ultraviolet

Clean-up: IEC = ion exchange chromatography; LLE = liquid-liquid extraction; SPE = solid-liquid extraction; IPR = ion pair reagent; PVPP = polyvinylpoly-pyrrolidone; PVP = polyvinyl-pyrrolidone. (1) pre-column; (2) on-column; (*) pre-derivatization, (**) post-derivatization

N = number of biogenic amines analyzed; SP = stationary phase; DR = derivatizing reagent

in practically all studies the LOD for the techniques used are calculated from biogenic amine chromatographic standards and do not take into account the effect of the matrix which normally increases these LOD (Busto *et al.*, 1995b). It is difficult to find a solution to the problem of determining LOD in chromatography, especially if we take into account that it is not easy to obtain an analyte-free wine with the same characteristics as the working matrix in biological samples in which these analytes are natural components. Pereira and Bertrand (1994) solve this problem by determining the LOD of each amine with a synthetic wine solution which has a similar matrix but which, of course, does not have its specific characteristics.

a) *Clean-up* systems

As well as filtering the sample, the most usual *clean-up* techniques are liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE).

As far as LLE techniques are concerned, the most widely used solvents are butanol (Pause and Mayer, 1972; Mayer and Pause, 1973b; Cerutti, 1975; Lehtonen, 1986), ethyl acetate (Buteau *et al.*, 1981; Rivas *et al.*, 1982; Baucom *et al.*, 1986), ethyl ether (Pause and Mayer, 1972; Mayer and Pause, 1973b; Ough and Daudt, 1981; Ough *et al.*, 1981; Vecchio *et al.*, 1989) and dichloromethane (Lehtonen, 1986), which, although they have not always preceded an HPLC, could be used just the same if the extract is suitably adapted to the type of chromatography to be carried out. All these methods are characterized by a long sample treatment which uses large volumes of organic solvents and which has high, very variable percentages of amine recuperation, depending on their polarity.

SPE techniques have developed quite considerably in recent years, in particular in connection with the perfection and the specificity of the

stationary phases which are used in the solid phase extraction cartridges. Gawdzik and Czerwinska-Bil (1991) and Jandera *et al.* (1994) have made a comparative study of different adsorbents for the clean-up of amines in hydrophilic samples. In wine analysis, SPE techniques are being slowly introduced, the most widely used adsorbents being the weak cationic exchangers formed by carboxylic groups (Lafon-Lafourcade, 1975; Ibe *et al.*, 1991; Zappavigna *et al.*, 1974; Plumas and Sautier, 1973; Cerutti, 1975), the strong cationic exchangers made up of sulphonic groups (Cerutti, 1975; Pfeiffer and Radler, 1992; Busto *et al.*, 1995a, 1996b) and octadecylsilane (C18) exchangers on silicon (Subden *et al.*, 1978; Busto *et al.*, 1994, 1995b, 1996c).

The cationic exchange resins cannot simultaneously concentrate biogenic amines without considerable losses if the elution is carried out in a strong acidic medium (Busto *et al.*, 1995a) although this concentration is achieved if the elution is carried out at a basic pH (Busto *et al.*, 1996b).

The amines can also be concentrated in two other ways: by using C18 cartridges if previously the amines are derivatised with derivatisants such as dansyl chloride which give stable derivatives (Busto *et al.*, 1994) or directly, without derivatizing, by adding ionic pair forming reagents (Busto *et al.*, 1995b).

Normally post-derivatization is more advisable because it gives all the amines an apolar, homogeneous chemical structure which is also different from the structure of the rest of the components of the matrix. So an extractant of greater specificity can be chosen, both in LLE and in SPE. However, a post-derivatization extraction cannot be applied when the derivatives suffer from limited stability, as is the case for the derivatives from the OPA reaction.

Another factor which has to be taken into account when working with wines is the specific interference of polyphenolic substances. Polyvinylpyrrolidone (PVP) (Busto *et al.*, 1994) and polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) (Mayer and Pause, 1984a-b) are normally used to remove these substances, although other procedures have been tried, e.g. SPE with anionic exchanger cartridges (SAX) carried out before neutralizing the amines (Busto *et al.*, 1995b, 1996c) or, for simple samples, SPE with octadecylsilane cartridges (Pfeiffer and Radler, 1992; Busto *et al.*, 1995b, 1996c).

b) Derivatizing reagents

Since the aliphatic biogenic amines do not have chromophore groups which give pronounced absorption in the UV-Vis region, derivatization techniques have to be resorted to in order to increase the sensitivity of the detection (Seiler and Demisch, 1978; Knapp, 1979). Obtaining fluorescent derivatives is the most widely used method since it can determine low concentrations of amines with great sensitivity and selectivity.

Table 6 shows the derivatization conditions and the characteristics of the most used derivatizing reagents in the determination of biogenic amines in wine, as well as the properties of the reaction product obtained, since these will condition the type of sample *clean-up* and the amine concentration technique to be applied.

DnsCl has the advantage of giving stable derivatives with primary and secondary amines which can be determined both by UV detection and fluorescence, although it is not very sensitive (pmol) and has the drawback that it gives complex chromatograms because it gives more than one reaction product, so interfering in the detection of the amines. It also reacts with phenols, aliphatic alcohols and some sugars (Bartók *et al.*, 1992).

	PITC	FLURAM	FMOC	OPA/ME	AQC	DnsCl	Ninhydrin
Usual detection	UV	UV/FL	FL.	UV/FL	FL	UV/FL	FL
Optimum detection sensitivity	pmol	pmol	fmol	fmol	fmol	pmol	nmol
Derivative stability	good	good	excellent	poor	excellent	excellent	good
Kinetics of the reaction	average	fast	fast	fast	fast	slow	slow
Secondary amines	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes
Single product reaction	Yes	No	No	Yes	Yes	No	Yes
Specificity	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No
Usual derivatization	1	1, 2	1	1, 2, 3	1	1	1, 2
pH of reaction medium	8-9	7.0	7.7	9-11	8.2-10	9.5-10	5.5
Solubility in a medium...	aqueous	organic	organic	aqueous	organic	organic	organic
Excess reagent peak	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	No
Reaction temperature	r.t.	r.t.	r.t.	r.t.	r.t.	variable	variable
Cost of the reagent	average	high	average	low	high	average	low

Table 6. Derivatizing reagents usually used in the HPLC analysis of biogenic amines in wines 1= pre-column, 2 = post-column and 3 = on-column; r.t. = room temperature

The advantage of OPA is its great sensitivity (fmol) and speed of reaction, although it only reacts with primary amines and gives some derivatives (isoindoles) of limited stability. This is the great handicap which all the researchers working with OPA (Buteau *et al.*, 1981; Allison *et al.*, 1984) find and there are a wide range of studies which try to find solutions to this problem. OPA is not a reagent which is intrinsically fluorescent, although the isoindoles resulting from the reaction are. Their stability depends on the amine itself, on the excess of OPA, and above all, on the nature of the nucleophile (thiol) used in the cycling reaction. One way of approaching the problem of instability of the OPA-derivatives will be, then, to study different nucleophiles (Kehr, 1993) or to vary the reaction medium once the reaction has been carried out (Buteau *et al.*, 1981). The most widely used nucleophile is mercaptoethanol (ME). Below, if we do not say otherwise, when we refer to the OPA derivatizing agent, we shall be talking of OPA/ME.

Even so, OPA is the most widely used derivatising reagent. The instability of the derivatives can be avoided by using automatic injectors in which the

derivatisation takes place in the injection block itself (Lehtonen *et al.*, 1992; Pereira and Bertrand, 1994; Busto *et al.*, 1995a-b, 1996a-b) or by carrying out a post-column derivatisation, although so far it has not been applied to wines (Allenmark *et al.*, 1985; Straub *et al.*, 1993; Izquierdo *et al.*, 1993). Recently, it has been proposed that OPA could be used in an *on-column* derivatisation system in which the reagent is a part of the mobile phase (Busto *et al.*, 1996c).

The reagent AQC has been used recently in the derivatisation of aqueous samples as an alternative to OPA (Nimura *et al.*, 1986; Cohen and Michaud, 1993; Díaz *et al.*, 1996). This derivatising agent reacts with primary and secondary amines, giving stable derivatives although the excess of reagent and the reaction by-products make it difficult to detect some amines (Busto *et al.*, 1996a-b). Sensitivity is of the same order as that obtained with OPA (fmol).

Likewise, there is no need to resort to derivatising agents. Ionic pair chromatography can be used with chromophores as the reagents (Gennaro and Abrigo, 1991).

c) Mobile and stationary phases

As can be seen in Table 6, amines are usually analysed by HPLC using reverse phase chromatography, and the stationary phase normally used is octadecylsilane (C18). As an exception, Ibe *et al.* (1991) and Pfeiffer and Radler (1992) have used a phase of similar characteristics (C8) and Battaglia and Frölich (1978) and Aerny (1982) have used normal phase chromatography.

The mobile phases mainly consist of buffered binary systems which combine water with different modifiers such as tetrahydrofuran and/or triethanolamine, and methanol and acetonitrile as organic eluents.

The predominant mobile phase in all these studies is close to being neutral or is slightly basal, which has the drawback that it limits the average life of the silica based columns. The use of polymer based columns partially gets round this drawback (Busto *et al.*, 1996c).

d) Detection systems

The most usual methods of detection in the analysis of biogenic amines are UV-Vis spectrophotometry ($\lambda_{\text{approx}} 250\text{nm}$) and fluorimetry. The latter method has been more widely used both in the direct detection of biogenic amines and their chemical derivatives (Hurst, 1990) because of its greater specificity and sensitivity.

The excitation and emission wavelengths which are most used in the detection of the dansyl derivatives are 360 and 460nm, respectively, whereas for the OPA-derivatives the most usual ones are 350 and 445nm.

Other detectors, such as the electrochemical (Wheatley and Tipton, 1987; Yi and Brown; Washington *et al.*, 1991) and the conductometric (Gennaro and Marengo, 1988), have been used to analyse amines in different types of aqueous samples although, up to the moment, they have not been applied to wines.

6. CONCLUSIONS

Of all the different analytical techniques used to determine biogenic amines in wines, HPLC has imposed itself on the others (Hurst, 1990). This technique stands out because it enables a great deal of amines to be simultaneously determined quickly and relatively simply.

In general, the approach to the problem of determining biogenic amines in wines by HPLC, should be based on their concentration level. Should we be interested in determining majority amines such as histamine, putrescine and tyramine, which are normally found at levels of higher than 1mg/l, direct determination by means of derivatisation with OPA can be used. A statistically validated procedure is the one described by Pereira and Bertrand (1994), although the instability of the OPA derivatives make it absolutely necessary to use automatic injectors for the on-line derivatisation.

To analyse the minority amines, with concentrations that are usually below 1mg/l, a previous concentration treatment is needed. SPE is, at present, the most versatile technique since it allows for pre- and post-derivatisation treatments using commercial SPE cartridges with different polarities (Busto *et al.*, 1994-1995, 1996b-c).

REFERENCES

- Addeo F, Malorni A (1974) Sulla presenza di ammine biologiche nei mosti e nelle bevande fermentate: uno studio analitico. *Sci Tecnol Aliment* IV: 241-245
- Aerny J (1982) L'histamine. Présence dans les denrées alimentaires et dans le vin en particulier. *Rev Suisse Vitic Arboric Hortic* 14: 7-13
- Aerny J (1985) Origine de l'histamine dans les vins. Connaissances actuelles. *OIV* 656-657: 1016-1019
- Aerny J (1990) Presence d'histamine et d'autres amines biogènes dans les vins. *FV OIV* 881

- Allenmark S, Bergström S, Enerbäck L (1985) A Selective Postcolumn O-Phthaldialdehyde-Derivatization System For The Determination Of Histamine In Biological Material By High-Performance Liquid Chromatography. *Anal Biochem* 144: 98-103
- Allison LA, Mayer GS, Shoup RE (1984) O-Phthaldialdehyde Derivatives Of Amines For High Speed Liquid Chromatography/Electrochemistry. *Anal Chem* 56: 1089-1096
- Almy I, Ough CS, Crowell EA (1983) Identification Of Two New Volatile Amines In Wine. *J Agric Food Chem* 31: 911-913
- Bartók T, Börcsök G, Sági F (1992) RP-HPLC Separation Of Polyamines After Automatic FMOC-Cl Derivatization And Precolumn Sample Clean-Up Using Column Switching. *J Liq Chromatogr* 15: 777-790
- Battaglia R, Fröhlich D (1978) HPLC Determination Of Histamine In Wine. *J High Resol Chr & Chr Comm* 2: 100-101
- Baucom TL, Tabacchi MH, Cottrell TH, Richmon BA (1986) Biogenic Amine Content Of New York State Wines. *J Food Sci* 51: 1376-1377
- Bauza T, Bali JP, Blaise A, Souli ML, Cabanis JC (1992) Les catecholamines dans les vins. *OIV FV* 931
- Bertrand A, Delas J (1992) Influence de la fertilisation azotée sur la composition des vins (carbamate d'éthyle, histamine) *INRA-VITI* 92: 54-56
- Bravo F, Burdaspal P, Suárez JA, Iñigo B (1983) Histaminogénesis en vinos. III. Fermentaciones de mosto de uva por asociaciones binarias levadura-bacteria. *Alimentaria* 148: 31-34
- Burdaspal PA, Caballo C, Pinilla I (1979) Estudio sobre la determinación analítica y la incidencia de histamina en vinos españoles. *Alimentaria* 106: 31-33
- Burlingame AL, Dell A, Russell DH (1982) Mass Spectrometry. *Anal Chem* 54: 363-409
- Busto O, Guasch J, Borrull F (1995b) Improvement Of A Solid-Phase Extraction Method For Determining Biogenic Amines In Wines. *J Chromatogr* 718: 309-318
- Busto O, Guasch J, Borrull F (1996a) Determination Of Biogenic Amines In Wine After Precolumn Derivatization With 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate. *J Chromatogr*, in press
- Busto O, Mestres M, Guasch J, Borrull F (1995a) Determination Of Biogenic Amines In Wine After Clean-Up By Solid-Phase Extraction. *Chromatographia* 40: 404-410
- Busto O, Miracle M, Guasch J, Borrull F (1996b) Solid Phase Extraction Of Biogenic Amines From Wine Before Chromatographic Analysis Of Their AQC-Derivatives. *J Liq Chromatogr*, in press
- Busto O, Miracle M, Guasch J, Borrull F (1996c) Determination Of Eight Biogenic Amines In Wines By HPLC With On-Column Fluorescence Derivatization *J Chromatogr*, to be published
- Busto O, Valero Y, Guasch J, Borrull F (1994) Solid Phase Extraction Applied To The Determination Of Biogenic Amines In Wines By HPLC. *Chromatographia* 38: 571-578
- Buteau C, Duitschaever CL, Ashton GC (1981) Stability Of The O-Phthaldialdehyde-Histamine Complex. *J Chromatogr* 212: 23-27
- Buteau C, Duitschaever CL, Ashton GC (1984a) High-Performance Liquid Chromatographic Detection And Quantitation Of Amines In Must And Wine. *J Chromatogr* 284: 201-210
- Buteau C, Duitschaever CL, Ashton GC (1984b) A Study Of The Biogenesis Of Amines In A Villard Noir Wine. *Am J Enol Vitic* 35: 228-236
- Cabanis JC (1985) L'histamine et sa toxicité. *Bull OIV* 656-657: 1009-1015
- Calull M, Marcé RM, Fàbregas J, Borrull F (1991) A Method For The Determination Of Histamine In Wine By HPLC With Precolumn Derivatization With Phenylisothiocyanate. *Chromatographia* 31: 133-136

- Cerutti G (1975) Recherche et dosage de l'histamine dans les vins. *FV OIV* 562
- Cerutti G, Cassa W, Finoli C, Vecchio A (1986) Ammine biogene nel vino. *Vignevini* XIII-12: 35-38
- Cerutti G, Finoli C, Vecchio A, Maccagnola P (1987b) Indices Of Quality For Beer. *Monatsschr Brauwiss* 40: 369-372
- Cerutti G, Margheri G, Bongini F (1987a) Sulla correlazione tra fermentazione malolattica ed ammine biogene vasoattive. *Vignevini* XIV-11: 39-42
- Cerutti G, Remondi L (1972) Istamina, tiramina et altre ammine fisse nei vini italiani. Nota I. *Riv Vitic Enol Coneg* 25: 66-78
- Chaytor JP, Crathorne B, Saxby MJ (1975) The Identification And Significance Of 2-Phenylethylamine In Foods. *J Sci Food Agric* 26: 593-598
- Cilliers JD, van Wyk CJ (1985) Histamine And Tyramine Content Of South African Wine. *S Afr J Enol Vitic* 6: 35-40
- Cohen SA, Michaud DP (1993) Synthesis Of A Fluorescent Derivatizing Reagent 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate, And Its Application For The Analysis Of Hydrolysate Amino Acids Via High-Performance Liquid Chromatography. *Anal Biochem* 211: 279-287
- Colagrande O (1992) Criteri di valutazione della qualità dei vini rossi. *Industrie delle Bevande* XXI: 197-204
- Daudt CE, Ough CS (1980) A Method For Detecting Volatile Amines In Grapes And Wines. *Am J Enol Vitic* 31: 356-359
- Desser H, Badion F, Klaering W (1981) Zur Kenntnis einiger biogener Amine des Traubenmostes und Traubenweines. *Mitt Klosterneuburg* 31: 231-237
- Díaz J, Lliberia JLI, Comellas L, Broto-Puig F (1996) Amino Acid And Amino Sugar Determination By Derivatization With 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate By HPLC And Fluorescence Detection. *J Chromatogr* 719: 171-179
- Droz C, Tanner H (1983) Bestimmung von biogenen aminen mittels RP-HPLC. *Schweiz Z Obst Weinbau* 119: 75-77
- Eerola S, Hinkkanen R, Lindfors E, Hirvi T (1993) Liquid Chromatographic Determination Of Biogenic Amines In Dry Sausages. *J Assoc Off Anal Chem Int* 76: 575-577
- Faeth KP, Radler F (1994) Untersuchung der Aminbildung bei Milchsäurebakterien. *Wein-Wiss* 49: 11-16
- Feier U, Goetsch PH (1993) Interlaboratory Studies On Precision Characteristics Of Analytical Methods. Determination Of Biogenic Amines In Fish And Fishproducts-HPLC Method. *Arch Lebensmittelhyg* 44: 134-135
- Frölich D, Battaglia R (1980) HPLC-Analyse von biogenen aminen in wein. *Mitt Geb Lebensmittelunters Hyg* 71: 38-44
- García J, Boza M, Pardos C (1994) Determinación de aminas biógenas en los vinos de Cataluña. *Jornada Técnica: Levaduras y Aromas*. Barbastro, Huesca, Spain
- Gawdzik B, Czerwinska-Bil U (1991) Porous Copolymer-Based Cation Exchanger For The Off-Line Preconcentration Of Aromatic Amines From Water. *Chromatographia* 32: 167-170
- Gennaro MC, Abrigo C (1991) Separation Of Food-Related Biogenic Amines By Ion-Interaction Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. Tyramine, histamine, 2-phenethylamine, tryptamine and precursor aminoacids. Application to red wine. *Chromatographia* 31: 381-386
- Gennaro MC, Marengo E (1988) Separation Of Aliphatic And Aromatic Amines By The Ion Interactin Reagent RP-HPLC Technique. *Chromatographia* 25: 603-608
- Gill (1990) Objective Analysis Of Seafood Quality. *Food Rev Int* 6: 681-714
- Giorgio B, Tisse C, Guerere M (1993) Mise au point d'une méthode de dosage des amines biogènes. Application aux conserves de sardines. *Sci Aliments* 13: 737-750

- Halasz A, Barath A, Simon L, Holzapfel W (1994) Biogenic Amines And Their Production By Microorganisms In Food. *Trends Food Sci Technol* 5: 42-49
- Henry M (1960) Dosage biologique de l'histamine dans les aliments. *Ann Fals Exp Chim* 24-33
- Herráiz M, Cabezudo MD, Llaguno C (1975) Aminas en cervezas y vinos. Separación e identificación por TLC. *An Bromatol* 27: 387-406
- Horner B (1992) Fish Smoking: Ancient and Modern. *Food Sci Technol Today* 6: 166-171
- Hornero D, Garrido A (1994) Biogenic Amines In Table Olives. Analysis By High-Performance Liquid Chromatography. *Analyst* 119: 2037-2041
- Hurst WJ (1990) A Review Of HPLC Methods For The Determination Of Selected Biogenic Amines In Foods. *J Liq Chromatogr* 13: 1-23
- Hurst WJ, Martin RA, Zoumas BI, Tarka SM (1982) Biogenic Amines In Chocolate. A Review. *Nutr Rep Int* 26: 1981-1086
- Ibe A, Saito K, Nakazato M, Kikuchi Y, Fujinuma F, Nishima T (1991) Quantitative Determination Of Amines In Wine By Liquid Chromatography. *J Assoc Off Anal Chem* 74: 695-698
- Ingargiola MC (1992) Étude du carbamate d'étyke dans les vins. *Ph D Thesis*. Institut d'Œnologie Université de Bordeaux II, France
- Ingargiola MC, Bertrand A (1991) Origine des amines biogènes dans les vins. *OIV FV* 896
- Ingles DL, Back JF, Gallimore D, Tindale R, Shaw JL (1985) Estimation Of Biogenic Amines In Foods. *J Sci Food Agric* 36: 402-406
- Iñigo B, Bravo F (1980) Histaminogénesis en vinos. I. Estudio de vinos de diversas regiones españolas. *Alimentaria* 117: 57-63
- Iñiguez M, Vázquez B (1994) Determination Of Biogenic Amines And Other Amines In Wine By An Optimized HPLC Method With Polarity Gradient Elution. *Am J Enol Vitic* 45: 460-463
- Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou M, Mariné-Font A (1993) Determination Of Biogenic Amines In Beers And Their Raw Materials By Ion-Pair Liquid Chromatography With Postcolumn Derivatization. *J Assoc Off Anal Chem Int* 76: 1027-1032
- Jakob L (1969) Die Hygiene im Kellereibetrieb. *Dtsch-Weinbau* 24: 446, 448-450
- Jandera P, Ventura K, Hladoniková R, Churáček J (1994) Comparison Of Various Sorbents For The Enrichment Of Samples Of Aliphatic Amines Using Solid-Phase Extraction Prior To The Determination By HPLC With Fluorimetric Detection. *J Liq Chromatogr* 17: 69-95
- Joosten MHLJ, Olieman C (1986) Determination Of Biogenic Amines In Cheese And Some Other Food Products By High-Performance Liquid Chromatography In Combination With Thermo-Sensitized Reaction Detection. *J Chromatogr* 356: 311-319
- Karmas E (1981) Biogenic Amines As Indicators Of Seafood Freshness. *Lebensm Wiss Technol* 14: 273-275
- Kehr J (1993) Fluorescence Detection Of Amino Acids Derivatized With O-Phthaldialdehyde (OPA) Based Reagents. *CMA/Microdialysis AB. Application Note* 16
- Knapp DR (1979) *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. New York: Wiley Interscience Publ., pp. 65-145
- Krieger SA (1993) The Use Of Active Dry Malolactic Starter Cultures. *Wine Industry Journal* Feb: 56-62
- Lafon-Lafourcade S (1974) Dosage d'histamine. *FV OIV* 499
- Lafon-Lafourcade S (1975) L'histamine des vins. *Connaiss Vigne Vin* 9 (2): 103-115

- Lehtonen P (1986) Isolation And HPLC Determination Of Amines In Wine. *Z Lebensm -Unters -Forsch* 183:177-181
- Lehtonen P, Saarinen M, Vesanto M, Riekkola M (1992) Determination Of Wine Amines By HPLC Using Automated Precolumn Derivatisation With O-Phthaldialdehyde And Fluorescence Detection. *Z Lebensm -Unters -Forsch* 194: 434-437
- Lovenberg W (1974) Psycho- And Vasoactive Compounds In Food Substances. *J Agr Food Chem* 22: 23-26
- Ma Y, Zhang R, Cooper L (1992) Indirect Photometric Detection Of Polyamines In Biological Samples Separated By High-Performance Capillary Electrophoresis. *J Chromatogr* 608: 93-96
- Mack D (1973) Bestimmung von Histamin in Wein mit dem automatischen Aminosäuren-Analysator. *Z Lebensm -Unters -Forsch* 152: 321-323
- Margueri G, Gianotti L, Mattarei C, Tonon D, Pellegrini R (1983) Evoluzione degli aminoacidi liberi nel corso della elaborazione dei vini spumanti di qualità del Trentino- Nota II. *Vignevini* 7-8: 27-32
- Marquardt P, Schmidt H, Spath M (1963) Histamin in alkoholischers getraiken. *Arzneim -Forsch* 13: 1100-1102
- Martín M (1975) Análisis de Histamina en vinos españoles. *An INIA/Ser Tecnol Agric* 2: 103-113
- Mayer K (1974) Teneurs des vins suisses en histamine. *FV OIV*: 466
- Mayer K, Pause G (1973a) Dosage de l'histamine dans les vins. *FV OIV*: 441
- Mayer K, Pause G (1973b) Détermination des amines non volatiles dans le vin. *FV OIV*: 449
- Mayer K, Pause G (1984a) Dosage Des Amines Biogènes Dans Le Vin Par Chromatographie En Phase Liquide A Haute Performance. *FV OIV*: 781
- Mayer K, Pause G (1984b) Bestimmung von biogenen aminen in wein mit hochleistungsflüssigkeitchromatographie. *Lebensm -Wiss Technol* 17: 177-179
- Mentasti E, Sarzanini C, Abollino O, Porta V (1991) Chromatographic Behaviour Of Homologous Amines: Comparison Of Derivatizing Agents, Columns And Mobile Phases. *Chromatographia* 31: 41-49
- Millies KD, Zimlich K (1988) Histamingehalte von weinen und schaumweinen. *Weinwirtschaft-Technik* 1: 21-24
- Montedoro G, Bertuccioli M (1986) The Flavour Of Wines, Vermouth And Fortified Wines. In: *Developments in Food Sci.* Morton and Macleod Editors, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, pp 171-238
- Moret S, Bortolomeazzi R (1992) Improvement Of Extraction Procedure For Biogenic Amines In Foods And Their High-Performance Liquid Chromatographic Determination. *J Chromatogr* 591: 175-180
- Nimura N, Iwaki K, Kinoshita T, Takeda K, Ogura H (1986) Activated Carbamate Reagent As Derivatizing Agent For Amino Compounds In High Performance Liquid Chromatography. *Anal Chem* 58: 2372-2375
- Nykänen L, Suomalainen H (1983). *Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages*, Dordrecht: D. Reidel Publi. Co., pp. 211-233
- OIV (1983) Compte rendu des travaux de la Sous-Commission conventionnelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. *Bull OIV* 631-632: 649-652
- OIV (1984) Compte rendu des travaux de la Sous-Commission conventionnelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. *Bull OIV* 646: 985-988
- OIV (1985) Compte rendu des travaux de la Sous-Commission conventionnelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. *Bull OIV* 656-657: 995-996

- OIV (1989) Compte rendu des travaux de la Sous-Commission conventionnelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. *Bull OIV* 705-706: 808-809
- OIV (1991a) Compte rendu des travaux de la Sous-Commission conventionnelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. *Bull OIV* 719-720: 31-32
- OIV (1991b) Compte rendu des travaux de la Sous-Commission conventionnelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. *Bull OIV* 727-727: 716-718
- OIV (1993) Compte rendu des travaux de la Sous-Commission conventionnelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. *Bull OIV* 747-748: 382-383
- OIV (1994a) Compte rendu des travaux de la Sous-Commission conventionnelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. *Bull OIV* 755-756: 54-55
- OIV (1994b) Compte rendu des travaux de la Sous-Commission conventionnelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. *Bull OIV* 763-764: 804-806
- Ough C (1971) Measurement of histamine in California wines. *J Agric Food Chem* 19: 241-244
- Ough CS, Amerine MA (1988) Nitrogen compounds. In: *Methods for Analysis of Musts and Wines* (2nd edition). Wiley Interscience, New York, pp. 186-187.
- Ough CS, Daudt CE (1981) Quantitative Determination Of Volatile Amines In Grapes And Wines. I. Effect Of Fermentation And Storage Temperature On Amine Concentrations. *Am J Enol Vitic* 32: 185-188
- Ough CS, Daudt CE, Crowell EA (1981) Identification Of New Volatile Amines In Grapes And Wines. *J Agric Food Chem* 29: 938-941
- Pause G, Mayer K (1972) Bestimmung von biogenen Aminen in Wein. *Wein-Wissenschaft* 27: 174-177
- Pereira MJ, Bertrand A (1994) Validation d'une méthode de dosage. Application à l'analyse des amines biogènes du vin. *Bull OIV* 765-766: 918-962
- Pfannhauserr W, Pechanek U (1984) Biogene amine in lebensmitteln: bildung, vorkommen, analytik und toxikologische bewertung. *Z Gesamte Hyg Ihre Grenzgeb* 30: 66-76
- Pfeiffer P, Radler F (1992) Determination Of Ethanolamine In Wine By HPLC After Derivatization With 9-Fluorenylmethoxycarbonylchloride. *Am J Enol Vitic* 43: 315-317
- Plumas B, Sautier C (1973) Méthode de dosage simultane de l'histidine et de l'histamine dans les liquides biologiques. Applications aux vins. *FV OIV* 442,
- Puputti E, Suomalainen H (1969) Über die biogenen amine der weine. *Mitt Klosterneuburg* 19: 184-192
- Rivas JC, García C, Gómez A, Mariné A (1979) Spectrofluorometric Determination And Thin Layer Chromatographic Identification Of Tyramine In Wine. *J Assoc Off Anal Chem* 62: 272-275
- Rivas JC, Pindado P, Mariné A (1982) Contenido de tiramina en vinos, otras bebidas alcohólicas y vinagres. *Rev Agroquím Tecnol Aliment* 22: 133-138
- Rivas JC, Santos JF, Mariné A (1983) Study Of The Evolution Of Tyramine Content During The Vinification Process. *J Food Sci* 48: 417-418,429
- Santos C, Jalón M, Mariné A (1985) Contenido en tiramina en alimentos de origen animal. I. Carne, derivados cárnicos y productos relacionados. *Rev Agroquím Technol Aliment* 25: 362-368

- Sayem-el-daher N, Simard R, L'Heureux L, Roberge A (1983) Determination Of Mono-, Di- And Polyamines In Foods Using A Single-Column Amino Acid Auto-Analyzer. *J Chromatogr* 256: 313-321
- Schereier P (1979) Flavor Composition Of Wines: A Review. *CRC Crit Rev Sci Nutr* 12: 59, 93
- Schmitt R, Haas J, Amadò R (1988) Bestimmung von biogenen aminen mit RP-HPLC zur erfassung des mikrobiellen verderbs von schlachtgeflügel. *Z Lebensm -Unters -Forsch* 187: 121-124
- Schneyder J (1973) Histamine et substances similaires dans les vins. Causes de leur formation. Méthodes de leur élimination du vin. *Bull OIV* 46 (511) 821-831
- Seiler N (1977) Chromatography Of Biogenic Amines.I. Generally Applicable Separation And Detection Methods. *J Chromatogr* 143, 221-246
- Seiler S, Demisch L (1978) Fluorescent Derivatives. En: *Handbook of derivatives for Chromatography*. Blau & King Editors, Londres: Ed. Heyden & Son, pp. 346-390
- Shalaby AR (1993) Survey On Biogenic Amines In Egyptian Foods: Sausage. *J Sci Food Agric* 62: 291-293
- Sieber R, Lavanchy P (1990) Gehalt an Biogenen Aminen in Milchprodukten und in Kaese. *Mitt Geb Lebensmittelunters Hyg* 81: 82-105
- Silva A, Colagrande O (1987) La cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) nel controllo di alcuni indici di qualità dei vini. *Industria delle Bevande* 16: 81-97, 104
- Smith JL, Palumbo SA (1981) Microorganisms as food additives. *J Food Protec* 44: 936-955
- Stratton J, Hutkins R, Taylor S (1991) Biogenic Amines In Cheese And Other Fermented Foods: A Review. *J Food Protec* 54: 460-470
- Straub B, Schollenberger M, Kicherer M, Luckas B, Hammes W (1993) Extraction And Determination Of Biogenic Amines In Fermented Sausages And Other Meat Products Using Reversed-Phase-HPLC. *Z Lebensm -Unters -Forsch* 197: 230-232
- Subden RE, Brown RG, Noble AC (1978) Determination Of Histamines In Wines And Musts By Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J Chromatogr* 166: 310-312
- Suomalainen H, Nykkanen L, Eriksson K (1974) Composition And Consumption Of Alcoholic Beverages- A Review. *Am J Enol Vitic* 25: 179-187
- Takatsuki K, Kikuchi T (1990) Determination Of N-Nitrosodimethylamine In Fish Products Using Gas Chromato-graphy With Nitrogen-Phosphorus Detection. *J Chromatogr* 508: 357-362
- Tejedor C, Mariné A (1978) Histamina en alimentos. *Alimentaria* 90: 45-54
- Tejedor C, Mariné A (1979) Histamina en vinos. Contenido en vinos españoles y estudios preliminares sobre su evolución en la vinificación. *Rev Agroquím Tecnol Aliment* 19/2: 261-269
- Tricard C, Cabazeil JM, Salagoity MH (1991) Dosage des amines biogènes dans les vins par HPLC. *Analisis M* 19: 44, 53-54
- Tricard Ch, Cabazeil JM (1990) Dosage des amines biogènes dans les vins par HPLC. *FV OIV*: 850
- Ulla MC, Vidal MC, Mariné A (1989) Tiramina y tirosina durante la vinificación. *Rev Agroquím Tecnol Aliment* 29: 221-229
- Vecchio A, Finoli C, Cerutti G, Moedler F (1989) Ammine biogene in vini italiani. *Vignevini* 16: 57-59
- Vidal Carou MC (1987) Aminas biógenas en vinos: histamina y tiramina. Análisis, contenidos y evolución. *Ph D Thesis*. Facultad de Farmacia. University of Barcelona. Spain
- Vidal MC, Mariné A (1985) Histamina en vinos. *Rev Agroquím Tecnol Aliment* 25: 59-75

- Vidal MC, Ambatlle A, Ulla MC, Mariné A (1990) Histamine And Tyramine In Spanish Wines: Their Formation During The Winemaking Process. *Am J Enol Vitic* 41: 160-167
- Vidal MC, Codony R, Mariné A (1991) Changes In The Concentration Of Histamine And Tyramine During Wine Spoilage At Various Temperatures. *Am J Enol Vitic* 42: 145-149
- Vidal MC, Izquierdo ML, Mariné A (1989) Spectrofluorometric Determination Of Histamine In Wines And Other Alcoholic Beverages. *J Assoc Off Anal Chem* 72: 412-415
- Walther H, Friedli F, Schlunegger UP (1987) Profiling And Quantification Of Biogenic Amines In Wine By Constant B²E Linked Scan Mass Spectrometry. *Biomed Environ Mass Spectrom* 14: 229-233
- Washington B, Smith M, Robinson T, Olubadewo J, Ochillo R (1991) A Rapid Qualitative And Quantitative Method Of Assaying Histamine In Small Plasma Volume. *J Liq Chromatogr* 14: 2189-2200
- Wheatley AM, Tipton KF (1987) Determination Of Tyramine In Alcoholic And Nonalcoholic Beers By High Performance Liquid Chromatography With Electrochemical Detection. *J Food Biochem* 11: 133-142
- WHO (1991) *International Digest of Health Legislation* 42 (4): 692
- WHO (1992) *International Digest of Health Legislation* 43 (2): 325
- WHO (1993) *International Digest of Health Legislation* 44 (3): 467
- Wills RBH, Silalahi J, Wootton M (1987) Simultaneous Determination Of Food-Related Amines By High-Performance Liquid Chromatography. *J Liq Chromatogr* 10: 3183-3191
- Woidich H, Pfannhauserr W, Blaicher G, Pechanek U (1980) Beitrag zur Untersuchung von biogenen aminen in rot- und weissweinen. *Mitt Klosterneuburg* 30: 27-31
- Yamamoto S, Wakabayashi S, Makita M (1980) Gas-Liquid Chromatographic Determination Of Tyramine In Fermented Food Products. *J Agric Food Chem* 28: 790-793
- Yen GCh, Chandra T (1988) Biogenic Amines In Alcoholic Beverages Produced In Taiwan. *J Sci Food Agric* 44: 273-280
- Yi Z, Brown PR (1990) Analysis Of Biogenic Amines And Their Acidic Metabolites By Reversed-Phase Liquid Chromatography With Electrochemical Detection. *J Liq Chromatogr* 13: 2161-2177
- Zappavigna R, Brambati E, Cerutti G (1974) Ricerca e determinazione delle ammine non volatili in vini, succhi, birra, aceto. *Riv Vitic Enol* 27: 285-294
- Zappavigna R, Cerutti G (1973) Non Volatile Amines In Italian Wines. *Lebensm -Wiss Technol* 6: 151-152
- Zee JA, Simard RE, L'Heureux L, Tremblay J (1983) Biogenic Amines In Wines. *Am J Enol Vitic* 34: 6-9

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

CAPÍTULO III

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

El estudio bibliográfico efectuado en el capítulo precedente permite establecer las bases sobre las que se desarrolla la parte experimental de la presente Tesis Doctoral. Así, del mencionado estudio se desprende que la *HPLC* es la técnica mayoritariamente implicada en la separación de las aminas biógenas, mientras que la detección habitual es la que se realiza por absorbancia UV-Vis o por fluorescencia, dependiendo del agente cromo o fluorigénico empleado en la reacción de derivatización. Entre los reactivos más utilizados a este respecto, el OPA es el que más aceptación ha alcanzado dada la posibilidad que ofrece de efectuar un análisis rápido, sensible y perfectamente reproducible si se dispone de un inyector automático. En su defecto, el DnsCl se constituye en una buena alternativa, siendo de hecho el segundo reactivo más utilizado en la derivatización de aminas biógenas.

A diferencia de lo que ocurre con la derivatización, la separación o la detección, no existe uniformidad de criterios en el uso de los sistemas de *clean up* y/o preconcentración utilizados con el fin de mejorar la calidad de los métodos analíticos ensayados. La *LLE* es el sistema tradicionalmente propuesto para extraer los aminocompuestos de la matriz vínica, principalmente debido a su sencillez de aplicación. No obstante, su baja reproducibilidad y la disparidad de recuperaciones resultante (función directa de la polaridad de las aminas y del disolvente utilizado en la extracción) hace que no sea el sistema más aconsejable en este sentido.

De acuerdo con estas premisas, la planificación del trabajo experimental en este tercer capítulo se comprende desde el punto de vista de una disponibilidad instrumental limitada a un sistema convencional de *HPLC* (carente de inyector automático y de detector de fluorescencia) en el momento en el que se inició la tesis. Por tanto, el método de determinación de aminas biógenas propuesto se basa en la cromatografía de sus derivados

dansilados. La limitación de sensibilidad que supone el uso del DnsCl como agente derivatizante y la detección de los analitos por absorbancia UV, se compensa mediante el uso de la extracción en fase sólida como técnica de preconcentración de las dansilamidas, dado el carácter estable que poseen.

Para llevar a cabo el trabajo descrito en este capítulo se seleccionaron 20 aminas biógenas a partir de una exhaustiva revisión bibliográfica de las investigaciones de interés enológico realizadas entre los años 1970 y 1992.

El trabajo experimental inicial está basado en el realizado por Lehtonen en 1986 [1]. Sobre él se optimizó la separación cromatográfica y, seguidamente, las condiciones de derivatización y del proceso de extracción propuestos en la parte experimental.

A) OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN

Virtualmente todos los procedimientos cromatográficos pueden aplicarse en la separación de las dansilamidas pero, dadas las características de las mismas, los procesos más adecuados son los que emplean la *RP-HPLC* y, más concretamente, los que emplean las columnas de octadecilsilano.

El sistema de elución cuando se trabaja con un número elevado de analitos tiene que ser necesariamente un gradiente de polaridad. Dado que además en nuestro caso los compuestos adquieren una estructura homogénea después de la derivatización, es imprescindible recurrir a un gradiente de elución multilineal para impedir que los analitos más apolares queden prolongadamente retenidos en la columna. Puesto que el eluyente no absorbe a la longitud de onda de trabajo, no se observa deriva de la línea base en ninguno de los cambios de eluyente efectuados.

La fase móvil es una mezcla binaria de acetonitrilo y agua a la que se llegó tras diversas pruebas con composiciones ternarias de estos dos eluyentes con etanol, metanol o tetrahidrofurano que no mejoraban ostensiblemente la separación. La resolución entre picos adyacentes fue el criterio a optimizar, tanto en el establecimiento del gradiente de elución como en la termostatación a 60°C de la columna analítica.

En el proceso de separación no pudo evitarse que el patrón interno (la heptilamina, escogida de acuerdo con numerosas referencias bibliográficas) eluya en último lugar. Como es sabido, es conveniente que el patrón interno en un sistema cromatográfico muestre un tiempo de retención intermedio, apareciendo en la zona central del cromatograma. No obstante, el número elevado de analitos y la posibilidad de que otras aminos de cadena más corta sí pudieran encontrarse en el vino, primó el uso de la heptilamina como patrón interno a pesar de eluir en último lugar.

En la optimización de la separación es inevitable la presencia de los aminoácidos en las muestras de vino y que eluyen en la zona inicial del cromatograma debido a su mayor polaridad. Ciertos tratamientos pueden reducir su contenido pero no eliminarlo totalmente, con lo que siempre tendrá que tenerse en cuenta su aparición en el cromatograma.

La detección de las aminos se realiza a 250 nm, longitud de onda a la que la serotonina, una de las aminos escogida inicialmente posee un coeficiente de extinción molar muy bajo, por lo que no puede cuantificarse junto al resto si no se dispone de un detector de diodos integrados que permita una programación de longitudes de onda. No obstante, su presencia en vinos es bastante limitada.

La identificación de las aminas se realiza en base a sus tiempos de retención, por comparación con cromatogramas patrón obtenidos con un vino sobre el que se efectúan adiciones estándar de todas ellas. En las muestras con identificaciones dudosas, se ha recurrido a la adición estándar de los patrones sobre ellas, comparando las alturas de picos resultantes.

B) OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DERIVATIZACIÓN

El cloruro de 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilo (CAS N° 605-65-2) o cloruro de dansilo (DnsCl) reacciona con grupos amino primarios y secundarios en medio débilmente alcalino (figura III.1). También reacciona, en las mismas condiciones, con imidazoles, fenoles y algunos alcoholes (a pHs mayores). Las aminas terciarias también pueden reaccionar, en menor extensión, especialmente a pH y temperatura elevados [2].

Entre las variables optimizadas que afectan a la reacción de derivatización se encuentran la relación de agua/acetona en el medio de reacción y el volumen y la concentración de DnsCl.

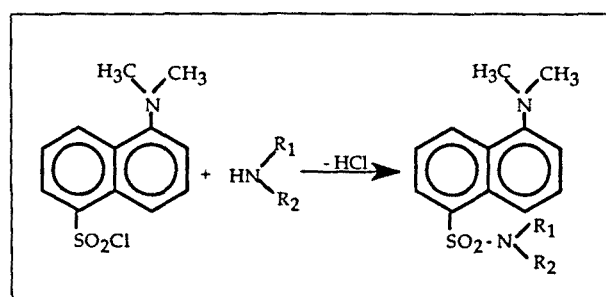


Figura III.1. Reacción de derivatización del DnsCl con las aminas

Aunque normalmente la derivatización se realiza en mezclas de agua y acetona (1:3) a pH entre 9.5 y 10, el rendimiento de la reacción aumenta al aumentar el pH. Por este motivo la optimización de las condiciones de derivatización se llevó a cabo sobre muestras fortificadas de vino sintético (solución hidroalcohólica al 11%, pH 3.8) a pH 10.0-10.5, sin sobrepasar este último valor dado que un pH mayor provoca un aumento de la hidrólisis del DnsCl [2]. El pH deseado se obtuvo con una solución amortiguadora de borato, dado que las pruebas con hidrogenocarbonato resultaron infructuosas debido a su escasa solubilidad en el medio acetónico en el que está disuelto el DnsCl.

La concentración y el volumen de DnsCl se optimizaron sobre una muestra de 5 ml del vino sintético con un contenido total de aminos de 10 mg/l. Las respuestas cromatográficas de todas las aminos, que se refieren a la de un patrón interno añadido al medio de reacción, aumentan hasta llegar a 1 ml de DnsCl del 1%, concentración que asegura el exceso suficiente para que se produzca la reacción de las aminos, como puede constatarse en la figura III.2. Este exceso tiene que asegurar la reacción de las aminos en presencia de otros compuestos como los aminoácidos y los fenoles, mayoritarios respecto a ellas, pero debe ser controlado si se quieren evitar reacciones secundarias no deseadas.

También la temperatura será un factor a tener en cuenta. Aunque la derivatización puede realizarse a temperatura ambiente, es aconsejable hacerlo a valores más altos para incrementar la velocidad de reacción.

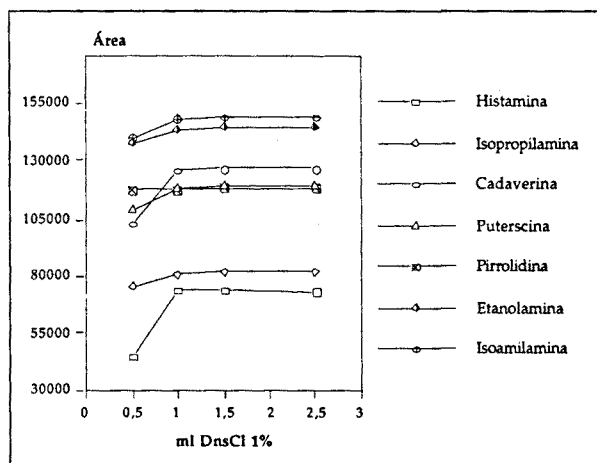


Figura III.2. Evolución de la respuesta cromatográfica frente al volumen de DnsCl para siete de las aminas estudiadas

Una de las ventajas más destacables de los dansilderivados es su extraordinaria estabilidad. Pueden conservarse hasta 2 meses si se tiene la precaución de salvaguardarlos de la luz y de mantenerlos a una temperatura no superior a 4°C.

Entre sus propiedades químicas hay que destacar su estabilidad frente a la hidrólisis ácida por la importancia que tendrá frente a una hipotética concentración en rotavapor. Muchas de las dansilamidas, además, también son resistentes a la hidrólisis básica, por lo que será fácil eliminar las interferencias de otros compuestos también derivatizados pero menos resistentes a la hidrólisis como es el caso de los ésteres alcohólicos y fenólicos y los imidazoles [3].

Linealidad y límites de detección

La evaluación de la precisión del método de derivatización se realiza calculando repetibilidad y reproducibilidad de las inyecciones realizadas con patrones sobre vino sintético. Se determinó asimismo el intervalo de linealidad de la respuesta en la zona de concentraciones habituales de las aminos en los vinos de acuerdo con la bibliografía. Finalmente se calculan los límites de detección instrumentales a partir de dos métodos alternativos: el de la relación $S/N = 3$ y el de Winefordner y Long [4].

C) OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

Puesto que el vino se trata de una matriz compleja en la que las aminos biógenas se encuentran en concentraciones muy inferiores a las de otros compuestos, se emplea un método de *clean up* de la muestra, previo a la derivatización, con el fin de eliminar la importante interferencia de los polifenoles. La eficacia de la columna analítica, a pesar de utilizar precolumna, puede verse afectada por el hecho de inyectar compuestos mayoritarios que pueden quedar retenidos irreversiblemente en la cabeza de la columna. Por otro lado, los polifenoles también reaccionan con el DnsCl a pH básico [2] con lo que interferirán, no sólo en la derivatización, sino en el proceso de concentración de aminos que se realiza seguidamente con el fin de aumentar la sensibilidad del método.

La etapa de *clean up* del vino puede realizarse, en base a la bibliografía, con carbono activo y con ácido tricloroacético. El primero, dado su gran poder adsorbente, fue descartado por su escasa selectividad. El segundo solamente es útil como agente desproteinizante de vinos blancos y rosados. La polivinilpirrolidona, un polímero de gran superficie de adsorción, se utiliza satisfactoriamente en la decoloración del vino. Es suficientemente selectivo,

no se necesitan cantidades importantes del mismo (4 g por 100 ml de vino) y decolora casi totalmente la muestra. En este proceso las aminos no se ven afectadas. El estudio de las recuperaciones de todas ellas indica que no quedan adsorbidas en la PVP, siendo la histamina y la triptamina las únicas que muestran pérdidas del 5%.

Por otro lado, también parte de los aminoácidos polifenólicos se eliminan mediante este *clean up*, con lo cual se simplifica la zona inicial del cromatograma, consiguiéndose una mejora sustancial de su línea base.

Dada la gran estabilidad de los dansilderivados, puede plantearse el hecho de concentrarlos en lugar de las aminos originalmente presentes en el vino, lo cual supone una ventaja importante en términos de selectividad y LOD.

Normalmente una concentración post-derivatización es más aconsejable porque se confiere a todas las aminos una estructura química apolar y homogénea que, además, es diferente de la del resto de componentes de la matriz, por lo que se puede escoger un extractante (tanto en LLE como en SPE) de mayor especificidad.

Extracción líquido-líquido

El estudio de la extracción líquido-líquido se llevó a cabo sobre un vino sintético partiendo de los datos encontrados en bibliografía (no siempre aplicados a vinos) que empleaban mayoritariamente el acetato de etilo, el éter y mezclas binarias de n-butanol con diclorometano o cloroformo. La extracción se aplicó sobre los derivados tras eliminar mediante rotaevaporación la acetona del medio de reacción. Los extractos obtenidos se llevan a sequedad y se redisuelven en acetonitrilo antes de inyectarlos en el cromatógrafo. El factor de concentración es de 100.

El éter ofreció los resultados más selectivos, aunque con baja recuperación de las aminas; el acetato de etilo, por el contrario, ofreció mejores resultados de recuperación pero peor selectividad. La mezcla del n-butanol con cloroformo impidió asignar los picos de las dansilamidas que eluían durante los primeros 20 minutos. Las mezclas de los otros extractantes, así como las de éter y acetato (ensayadas a la vista de los resultados obtenidos) no permitían una cuantificación adecuada de la histamina. En función de estos resultados se escogió como extractante el acetato de etilo, primando la mayor recuperación de las aminas, en especial la histamina, frente a su baja selectividad.

Una vez seleccionado el extractante, se procedió al cálculo de la recuperación del proceso global efectuando sobre un vino tinto una adición estándar de las 19 aminas. Solamente la 3-metilbutilamina (isoamilamina) pudo recuperarse cuantitativamente (98%). Metilamina, etilamina, morfolina, isopropilamina, propilamina, dietilamina, fenetilamina, amilamina, cadaverina y hexilamina pudieron asignarse, aunque no cuantificarse por su baja recuperación (30%). El resto, histamina incluida, no pudo ser identificada mediante este procedimiento [5].

Extracción en fase sólida

Así pues, se planteó la posibilidad de utilizar la extracción en fase sólida como alternativa a la extracción líquido-líquido tradicional, con el fin de mejorar la recuperación de las aminas, mejorando simultáneamente la selectividad del método.

Dado que la extracción se realiza sobre los derivados dansilados (estructura apolar) es necesario escoger un adsorbente de características apolares. Con la experiencia de los tiempos de retención exhibidos por las dansilamidas en la

separación cromatográfica, se pensó que quizá el octadecilsilano como adsorbente y el acetonitrilo como eluyente serían adecuados para efectuar la extracción en fase sólida. De esta manera, se efectuará simultáneamente *clean up* adicional de aquellos compuestos que podrían quedar retenidos irreversiblemente en la columna analítica.

El proceso previo de tratamiento de la muestras se realiza tal y como se ha descrito anteriormente, derivatizándose antes de proceder a la extracción sobre cartuchos comerciales de C_{18} activados y convenientemente acondicionados. El esquema global del procedimiento seguido es el que se muestra en la figura III.3. El proceso se halla sucintamente descrito en el artículo publicado en la revista *Chromatographia* que se incluye en el anexo de este capítulo.

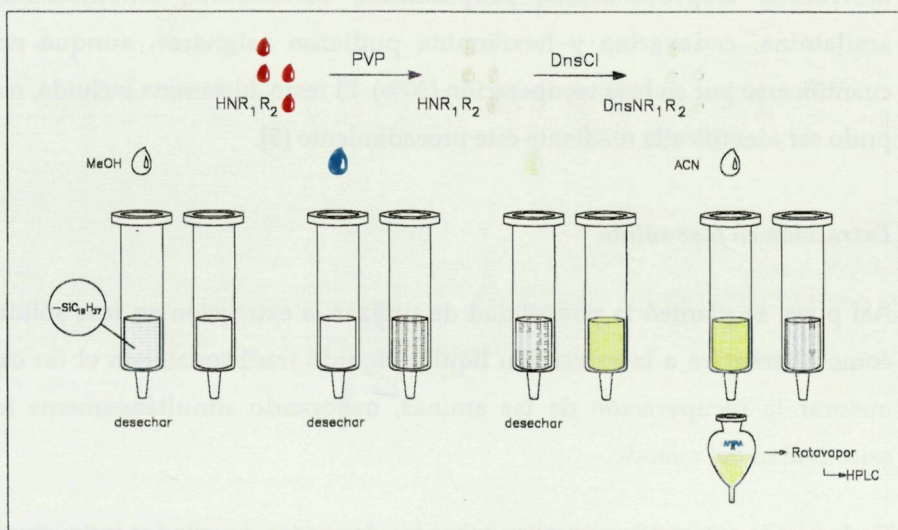


Figura III.3. Esquema del tratamiento de *clean up* y concentración aplicado en la parte experimental de este capítulo. La primera fase corresponde a la decoloración del vino y la derivatización de las aminas. La segunda, implica la fase de activación y acondicionamiento del C_{18} , el paso de la muestra a través del mismo y la posterior elución de los dansílderivados con ACN. La concentración se realiza en rotavapor a vacío.

Mediante el procedimiento descrito se determinaron los contenidos de aminas biógenas en diez muestras de vino, llegándose a la conclusión de que los vinos tintos superaban a los blancos en concentración de etilamina, propilamina, putrescina y cadaverina, mientras que los blancos contenían mayores cantidades de amoniaco, metilamina, morfolina e histamina. Este último valor resulta especialmente sorprendente debido a que la presencia de histamina suele estar asociada a procesos fermentativos a los que no se someten normalmente los vinos blancos (como la fermentación maloláctica).

D) CONCLUSIONES

Como todos los métodos de análisis por *HPLC*, éste presenta una serie de ventajas e inconvenientes sobre otras técnicas y procedimientos que veremos posteriormente. Entre las ventajas cabría destacar la extraordinaria estabilidad de los derivados obtenidos, lo que permite concentrar los analitos de estructura homogénea de forma mucho más selectiva que cuando se siguen procesos de concentración realizados prederivatización.

La baja polaridad del derivado de histamina hace que ésta eluya a un tiempo de retención alejado del que corresponde a los aminoácidos, con lo que su cuantificación es fácilmente realizable, a diferencia de lo que ocurre con los OPA-derivados, como tendremos ocasión de observar.

Otra de las ventajas es que el proceso de separación se realiza a pH ácido, con lo que se alarga la vida de la columna, enlazando este factor con una serie de ventajas económicas adicionales entre las que cabría destacar la sencillez de instrumentación requerida y el bajo coste del reactivo.

Entre los inconvenientes más reseñables encontramos la aparición de numerosos picos interferentes debido a la formación de los didansil

derivados de ciertas aminas [1] y el elevado tiempo de análisis, motivado por un excesivo tiempo de derivatización y la necesidad de mejorar la sensibilidad del método mediante los tratamientos de *clean up* y concentración descritos.

Entre los inconvenientes ligados a la instrumentación hay que destacar la sensibilidad limitada del método de detección por absorbancia UV de las dansilamidas (pmol), mejorable con un detector de fluorescencia [5], y su difícil automatización.

Los dansil-derivados pueden ser detectados por UV y por fluorescencia (excitación a 360 nm, emisión a 480 nm). Los límites de detección en la zona de los fmol solamente se han descrito para la detección fluorescente. Existen derivados análogos que contienen un grupo cromóforo (azobenceno) (DABS = cloruro de 4-dimetilaminoazobenceno-4'-sulfonilo) que pueden detectarse en la región del visible (436 nm).

El problema de la dansilación reside en el hecho de que es difícil obtener de forma reproducible productos de reacción únicos a partir de los grupos amino. Además, el reactivo presente en exceso produce una serie de compuestos que pueden interferir en la separación y la identificación.

Seguidamente se reproduce el artículo *Solid Phase Extraction Applied to the Determination of Biogenic Amines in Wines by HPLC* publicado en la revista *Chromatographia*. En él se recogen las experiencias de optimización de separación cromatográfica de los dansil-derivados, así como el protocolo de tratamiento con PVP y con cartuchos de octadecilsilano utilizados para mejorar la selectividad del método. El proceso de concentración, realizado mediante evaporación a vacío, permite rebajar los LODs del método.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. P. Lehtonen. *Z Lebensm -Unters -Forsch* 183:177 (1986)
- [2]. S. Seiler y L. Demisch. *Handbook of Derivatives for Chromatography*. Ed. Heyden & Son. Londres. pp. 346-390 (1978)
- [3]. R.F. Chen. *Arch Biochem Biophys* 120:609 (1967)
- [4]. R. Boqué y F.X. Rius. *J Chem Educ* 70:230 (1993)
- [5]. Y. Valero. *Tesis de Licenciatura*. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona (1993)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

CHROMATOGRAPHIA

Chromatographia, 38 (1994) 571-578

SOLID-PHASE EXTRACTION APPLIED TO THE DETERMINATION OF BIOGENIC AMINES IN WINES BY HPLC

O. Busto^a, Y. Valero^a, J. Guasch^a and F. Borrull^b

^aDepartament de Química, Escola d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Avda. Ramón y Cajal, 70
43005 Tarragona, Spain

^bDepartament de Química, Facultat de Química, Universitat Rovira i Virgili, Pça. Imperial Tàrraco, 1
43005 Tarragona, Spain

Received: Nov 29, 1993
Revised manuscript received: Jan 17, 1994
Accepted: Feb 8, 1994

SOLID PHASE EXTRACTION APPLIED TO THE DETERMINATION OF BIOGENIC AMINES IN WINES BY HPLC

Key Words: Column liquid chromatography, Wine, Biogenic amines, Solid-phase extraction, Derivatization

SUMMARY

A method suitable for the determination of 19 biogenic amines in wine has been developed. The method involves derivatization of amines by treatment with dansyl chloride and solid-phase extraction of the derivatives. Prior to the derivatization procedure, clean-up of the wine sample with polyvinylpyrrolidone was carried out. Reversed-phase gradient elution HPLC with UV detection at 250 nm was used to determine these compounds. Some consideration was given to the effect of the temperature on the separation process. Linearity of derivatization was obtained for amounts of all the biogenic amines ranging from 500 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ to 20 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Limits of detection (signal-to-noise ratio = 3) of the amines were similar for all the dansyl-derivatives (between 50 and 150 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Addition of standard amines was used for the determination of amine recoveries. These were better than 85 % for ethanolamine, tryptamine, phenethylamine, putrescine, cadaverine and histamine. The overall process was applied to identify and quantify biogenic amines in white and red wines.

INTRODUCTION

For many years it has been known that biogenic amines are present in a variety of foods including cheese, fish and meat [1-3], as well as in beverages such as wine and beer [4-7]. Biogenic amines are vasoactive compounds, and their pharmacological activity may turn into toxicity if large amounts of these substances are consumed. The consumption of foods containing high concentrations of these compounds may cause problems to some consumers

such as headache, nausea, cardiac palpitation and, in severe cases, intracerebral haemorrhage and death [8-15].

The identification of biogenic amines, especially histamine, in wine samples has been carried out by several investigations [12]. Their concentration in wine is generally very low. Nevertheless, several countries have fixed maximum concentrations for some of these compounds because of their potential toxicity; e.g., Switzerland recommends 4 mg l⁻¹ as the maximum of histamine present in wine, Netherlands 5 mg l⁻¹, Germany 2 mg l⁻¹ and France 8 mg l⁻¹ for the same substance [16].

More than 20 amines have been identified in wine and their total concentration has been reported to range from a few mg l⁻¹ to about 50 mg l⁻¹ depending on many factors, but in general it is related to the quality of wine. The most important amines are histamine, tyramine, putrescine (1,4-diaminobutane), cadaverine (1,5-diaminopentane), isoamylamine and β -phenethylamine.

Several analytical methods have been described in the past to isolate and determine specifically an individual amine [2, 17-19] or a certain range of them [20, 21]. The methods most commonly used in the determination of biogenic amines are thin-layer chromatography [22], gas chromatography [23, 24] and high-performance liquid chromatography (HPLC) [2, 16-18, 25, 26]. At the present time HPLC is the preferred method but, even so, it is necessary to increase the detection limit of the analytical method by derivatizing the compounds prior to their chromatographic determination.

The most commonly used amine derivatives suitable for fluorescence and UV detection after HPLC separation in matrixes such as wine are o-phthaldialdehyde (OPA) [18] and dansyl chloride (DnsCl) [25-27]. OPA has

a disadvantage in that it reacts only with primary amines and their derivatives are not stable, while dansyl chloride reacts with primary and secondary amino groups, and even tertiary amines in extreme reaction conditions. The greater stability of the dansyl derivatives compared with the OPA-derivatives provides another advantage in the use of this reagent because it allows subsequent concentration process without using automatic systems.

The determination of amines in a complex matrix such as wine is very difficult because they are usually present in very low concentrations. Moreover they absorb at low wavelengths, in which region there are many interfering substances. This problem has been resolved using a derivatization process to displace the absorbance wavelength to higher values thus increasing the detection limit of the method. Nevertheless, this procedure still has limitations when determining these compounds at low values, hence it is found necessary to carry out an additional extraction process.

An extraction process is essential in order to isolate the compounds of interest from the matrix and represents a very critical step. Several investigators carry out this extraction procedure from food matrixes (as cheese, beer and wine) prior to its derivatization by means of liquid-liquid extraction (LLE) using different organic solvents, such as ether [20, 28], n-buthanol/chloroform [27] or n-buthanol/dichloromethane [25]. However, the different polarities of the compounds studied leads to very different recovery values. On the other hand, some investigators carry out this extraction after the derivatization process with ethyl acetate [29, 30], chloroform [31] or methylene chloride [4] in order to obtain better recovery because of the similar polarity of the resulting derivatives. All of these studies show that the concentrations can vary depending on the extracting

reagent employed, and few of these studies have reported recovery of LLE. As we have observed, these LLE procedures often result in very low analytical recoveries, although in some cases good recovery is obtained for a few specific compounds.

Solid-phase extraction (SPE) has been used to determine amino acids derivatized with such compounds as OPA [32] and PTC [33] with good results. In a different approach selective determination of histamine was achieved after using SPE to remove amino acid compounds when PTC-derivatives were analyzed [34].

The aim of this work is to provide an HPLC method for the simultaneous determination of 19 specific biogenic amines which can be present in wine, using a SPE process to increase the selectivity and the detection limit of the method. At the same time the use of PVP results in the removal of other substances which can interfere in their derivatization and later quantification of the derivatives obtained.

EXPERIMENTAL

Equipment

Chromatographic experiments were performed using an HP 1050 liquid chromatograph with a UV spectrophotometer detector HP model 1050. The injection of the samples was carried out through a Rheodyne Model 7125 manual injector with a 20 μ l loop. Separation was carried out using a Spherisorb ODS-2 column (250 \times 4.6 mm i.d., particle size 5 mm) preceded by a guard-column packed with pellicular C₁₈; both column and guard-column were heated at 60° C. The detection of the compounds was

performed at 250 nm and the chromatographic data were collected and recorded in a HP ChemStation version A.01.01.

Reagents and Standards

The amines studied were: ammonia, amylamine, 1-butylamine, 1,4-diaminobutane, 1,5-diaminopentane, diethylamine, ethanolamine, ethylamine, hexylamine, histamine, isobutylamine, isopropylamine, methylamine, 3-methylbutylamine, morpholine, phenethylamine, propylamine, pyrrolidine and tryptamine, all of them supplied by Aldrich-Chemie. An individual standard solution of each amine was prepared in HPLC-grade acetone (Panreac) and stored in darkness at 4°C; the concentration of each solution were about 2000 mg·l⁻¹. A standard solution of the listed amines were prepared with an aliquot of each solution by diluting with acetone in a volumetric flask. More diluted solutions used in the different studies were prepared by further diluting this standard solution with acetone.

Heptylamine (99%, Aldrich) was chosen as an internal standard (ISTD). According to one study [24] heptylamine has a retention time not corresponding to the other eluted components, it does not occur naturally in wine samples and it gives good extraction recoveries.

Derivatization process: Dansyl chloride (Aldrich) with a purity of 95% and at concentration of 1% in acetone was used. A buffer solution of sodium tetraborate (3.81 g dissolved in 100 ml of distilled water and adjusted to pH 10.5 with 10M sodium hydroxide) was prepared in order to adjust the sample pH before synthesis of the derivatives. Both reagents were obtained from Panreac.

Chromatographic method: To carry out the chromatographic separation HPLC-grade acetonitrile (Scharlau) and Milli-Q quality water filtered through a 0.45 μm nylon membrane were used as mobile phases.

Clean-up: For the SPE, C_{18} cartridges (500 mg) (Varian) were utilised and polyvinylpyrrolidone (PVP) (Aldrich) was used as the wine bleaching agent.

Sample preparation

In the analytical method developed several steps preceding sample injection were taken into account: a) removal of the phenolic compounds with PVP, b) amine derivatization to the corresponding dansylamides, c) solid phase extraction of the resulting derivatives and, d) concentration of the sample prior to its injection.

- a) Before the derivatization of the sample, it is necessary to remove the phenolic compounds present in the wine, especially red wine, because of their interference in the later solid phase extraction conducted with C_{18} cartridges to isolate the prepared dansyl derivatives. To perform this step, 1 g of PVP is added to 25 ml of the wine sample, the resulting mixture is then stirred for 15 minutes and the decoloured wine is finally filtered through a No. 41 Whatman filter paper.
- b) Preparation of the derivatives was carried out using a modification of the procedure developed by Lehtonen [25] and Moret *et al.* [27]. For the derivatization process, 22 μl of the internal standard solution (2264 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) were added to an aliquot of 5 ml of the filtered wine or standard solution in a 10 ml volumetric flask. The resulting solution was then made basic (pH 10.5) by adding 1 ml of the buffer solution. 2 ml of 1%

DnsCl were then added and the overall solution was brought to a total volume of 10 ml with acetone/water 3/1. The reaction mixture was shaken, transferred to a 10 ml reaction-tube and then left for 25 minutes at 65°C in darkness.

- c) In the SPE process, each cartridge was activated with 5 ml of acetonitrile followed by 5 ml of deionized water. 5 ml of treated wine or standard solution was then passed through the cartridge and eluted with 2 ml of acetonitrile. The process was performed using a Bond Elut Vac-Elut system connected to a vacuum in order to control the flux rate at 1 ml min⁻¹.
- d) To increase the detection limit of the method, the acetonitrile eluted was concentrated down to 100 µl by a controlled vacuum with a rotary evaporator. This step can be omitted if the concentration of the amines is high.

High-performance liquid chromatography

Two solvent reservoirs containing the following eluents: (A) 5% acetonitrile in water and (B) acetonitrile, were used to separate the different amines with an HPLC elution computer program as follows: an initial gradient elution from 25% of solvent B (ACN) to 45% of the same solvent in 5 minutes, then, an isocratic elution until minute 30 followed by another linear elution to 60% until minute 50 and from 60% to 80% of B in five minutes more; finally, an isocratic elution at this percentage of B from minute 50 to minute 55. The program finished with five additional minutes to reach the initial conditions and the corresponding mobile phase stabilisation. Determination was performed at 60° C with a flow-rate of 1 ml min⁻¹ and the eluted

dansylamides were detected by monitoring their UV absorbance at 250 nm. Under these conditions all nineteen amines were eluted in less than 60 minutes.

The effect of temperature was also studied working at five different values (30, 40, 50, 60 and 70°C). The best resolution between the histamine and the hexylamine peaks was obtained when the temperature exceeded 60°C. Nevertheless, at 70°C the peaks corresponding to *i*-butylamine, 1-butylamine and tryptamine partially coeluted and therefore 60°C was selected and fixed as the working temperature in all the chromatographic experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the chromatogram resulting when a standard solution of the dansylamides was injected under the conditions previously specified. Relatively good resolution was obtained with the gradient elution used but requiring a relatively long analysis time. When the concentration of DnsCl is high in front of the amines, a shoulder can be seen in the peak corresponding to pyrrolidine by the coelution of the reagent peak. In this case, only a diode array detector which compares the spectra, can identify the presence of pyrrolidine in the sample. In our work, the ratio between the derivative reagent and the amines was optimized to obtain a good defined peak corresponding to the pyrrolidine derivative. However, this was only possible when working with standard solutions because in real samples this relationship can not be determined *a priori*; by this reason pyrrolidine cannot be determined by the established method.

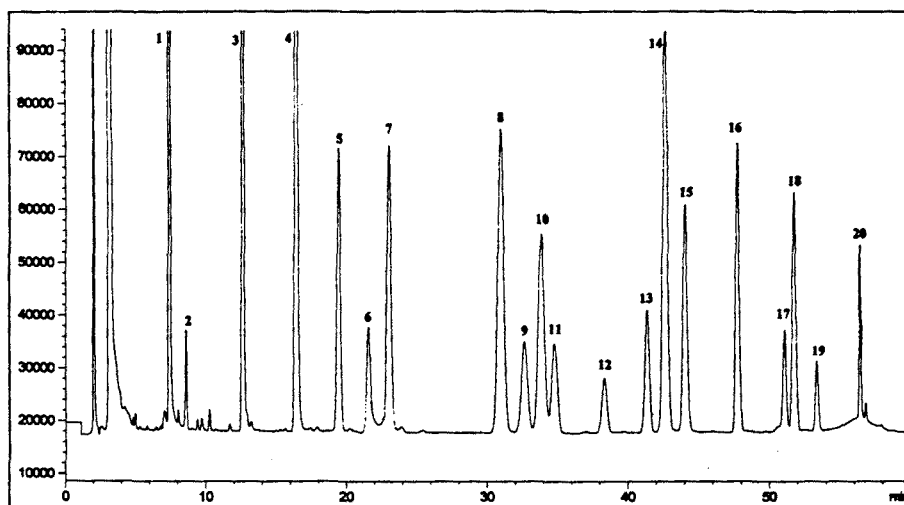


Figure 1. Optimum chromatographic separation of the dansylamide standard solution. 1: ethanolamine, 2: ammonia, 3: methylamine, 4: ethylamine, 5: morpholine, 6: i-propylamine, 7: propylamine, 8: pyrrolidine, 9: i-butylamine, 10: 1-butylamine, 11: tryptamine, 12: diethylamine, 13: phenethylamine, 14: 3-methylbutylamine, 15: amylamine, 16: 1,4-diaminobutane, 17: 1,5-diaminopentane, 18: hexylamine, 19: histamine and 20: heptylamine (istd).

In order to verify the linearity of the UV detector response at 250 nm over the working concentration of each amine, standard solutions of amines were diluted, derivatized and injected into the chromatograph. Calibration graphs of each amine were constructed by plotting the amine to ISTD peak-area ratios against the amine to ISTD concentration ratios. Linear least-squares regression was used to calculate the slope, intercept and correlation coefficient (r) by using the ULC (Univariate Linear Calibration) computer programme [35]. In all cases, a good correlation coefficient was obtained. The range of linearity shown was to relate to concentrations of the amines in wine samples, most of them were between 0.5 to 25 mg l⁻¹ except for ammonia (0.5 to 5 mg l⁻¹) and amylamine, 1,4-diaminobutane and ethylamine (0.5 to 20 mg l⁻¹). In the latter two cases the points obtained with

higher concentrations of standards resulted in outlier values in the linearity response and, consequently, they were eliminated.

The detection limit was calculated from the amount of amine required to give a $S/N = 3$ and was found to be between 50 and 150 $\mu\text{g l}^{-1}$ for the biogenic amines studied.

When this method is applied to wine samples, and particularly to red wine, phenolic compounds interfere in the determination of dansylamides because all of these compounds absorb at the operational wavelength. In addition these phenolic compounds react with DnsCl [17] and a decreased yield of derivatives was observed.

The phenolic compounds also interfere when a SPE with C_{18} is carried out, because they are adsorbed in the cartridge and thus reduce its retention capacity. Because of these problems, prior to the solid phase extraction, selective elimination of the phenolic compounds was carried out with PVP.

As PVP is a polymer used in winemaking in order to clean-up polyphenols from wine, test were made of amine recoveries after treatment with PVP. For this study, a red wine and the same red wine spiked with a standard solution of the amines were analyzed. The recovery of the method (table I) was established by comparison of the resulting chromatograms shown in figure 2a (without PVP treatment) and figure 2b (with PVP treatment). Comparing both chromatograms shows an increase in selectivity of the method for the more polar compounds, and a better baseline for the less polar compounds when the percentage of acetonitrile is increased to elute them. At the same time, the removal of the phenolic compounds by PVP results in a high ratio between DnsCl and the other possible compounds

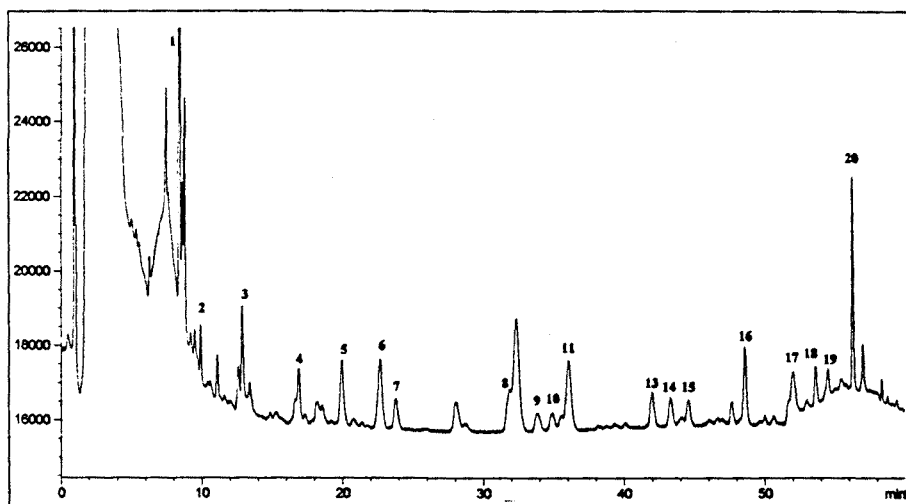


Figure 2a

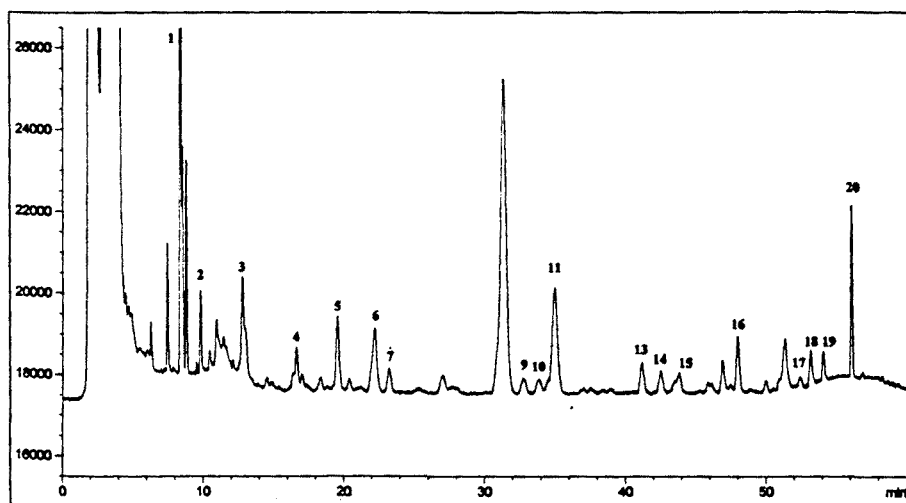


Figure 2 Chromatograms showing the influence of PVP pretreatment. 2a) Represents the wine without using the bleaching wine agent and 2b) the same wine after the PVP treatment. 1: ethanolamine, 2: ammonia, 3: methylamine, 4: ethylamine, 5: morpholine, 6: i-propylamine, 7: propylamine, 8: pyrrolidine, 9: i-butylamine, 10: 1-butylamine, 11: tryptamine, 12: diethylamine, 13: phenethylamine, 14: 3-methylbutylamine, 15: amylamine, 16: 1,4-diaminobutane, 17: 1,5-diaminopentane, 18: hexylamine, 19: histamine and 20: heptylamine (istd).

nº	Name	R	RSD
1	Ethanolamine	98	3.0
2	Ammonia	97	3.2
3	Methylamine	96	4.1
4	Ethylamine	95	2.7
5	Morpholine	96	2.3
6	i-Propylamine	100	3.6
7	Propylamine	96	4.2
8	Pyrrolidine	-	-
9	i-Butylamine	95	2.1
10	1-Butylamine	98	3.9
11	Tryptamine	94	7.6
12	Diethylamine	96	2.8
13	Phenethylamine	100	2.2
14	3-Methylbutylamine	98	2.9
15	Amylamine	93	3.9
16	1,4-Diaminobutane	97	4.2
17	1,5-Diaminopentane	95	2.3
18	Hexylamine	98	1.8
19	Histamine	93	2.1

Table I. Percentage recoveries with PVP pretreatment (R & RSD in %).
Results obtained from quintuple analysis of a red wine sample.
Conditions in text.

which can be derivatized. In the second chromatogram the area corresponding to the peak having the same retention time as the pyrrolidine derivative increases and is assigned as being due to a reagent peak, while in the first chromatogram it appears only as a shoulder. Thus it is impossible to determine pyrrolidine with the proposed procedure.

The results obtained in the study of recovery after PVP treatment are shown in table I, where it can be observed that the recovery is higher than 90% for all the amines with a good relative standard deviation.

SPE with octadecylsilane cartridges was tested as an alternative to LLE, in order to isolate dansylamides from the derivatization medium and to increase selectivity and the detection limit of the method. With this

procedure, it is possible to clean-up the sample, being simultaneously concentrated fifty times and thereby reaches a concentration within the range of linear response.

The recovery of the method was determined by a standard addition technique. A wine aliquot of 5 ml was spiked with a known amount of amine standard solution (500 µl of each amine stock solution and diluted to 10 ml. 5 µl of this solution were then added to the derivatization medium and made up to 10 ml with acetone/water 3/1 after addition of 5 µl of the concentrated ISTD to 5 ml of wine). After the derivatization process, acetone was removed under vacuum to give a total volume of 5 ml. This volume was passed through the cartridge and eluted with 2 ml of acetonitrile. These 2 ml were then concentrated to 100 µl under vacuum before injecting into the chromatograph.

Name	R	RSD
Etanolamine	89	5.2
Ammonia	66	6.3
Methylamine	60	6.4
Ethylamine	95	3.5
Morpholine	71	6.4
i-Propylamine	56	7.2
Propylamine	90	3.1
i-Butylamine	93	5.2
1-Butylamine	80	5.6
Tryptamine	89	4.8
Diethylamine	62	5.6
Phenethylamine	90	3.3
3-Methylbutylamine	62	5.7
Amylamine	82	4.2
1,4-Diaminobutane	86	4.5
1,5-Diaminopentane	87	3.8
Hexylamine	75	4.2
Histamine	93	4.0

Table II. Recoveries (R/RSD %) obtained from 5 analysis of the wine used in table I.

The results obtained from the corresponding chromatographs are given in table II. High recoveries for most of the dansylamides were obtained. It is important to note the high recoveries (close to 90%) obtained for the most important amines in wine such as tryptamine, propylamine, 1,4-diaminobutane (putrescine), 1,5-diaminopentane (cadaverine) and histamine. Furthermore the RSD obtained is acceptable (less than 8%) for each amine studied with the method described.

The clean-up with PVP and the rear extraction procedure described were applied to five different red and white wines from the Catalanian region.

Figures 3 and 4 are chromatograms obtained for one of the white wines analysed and for one of the red wines studied, respectively. In table III the maximum and the minimum concentrations found are laid out.

Name	White	Red
Ethanolamine	0.32-1.21	0.56-3.24
Ammonia	2.03-4.74	1.55-6.47
Methylamine	0.31-0.78	NQ -0.33
Ethylamine	NQ -0.35	0.26-1.54
Morpholine	0.49-1.33	NQ -0.27
Propylamine	1.26-2.67	NQ -1.35
Diethylamine	NQ	ND
Phenethylamine	NQ	NQ
3-Methylbutylamine	NQ	ND
Amylamine	NQ -0.45	ND
1,4-Diaminobutane	0.23-0.79	3.02-15.1
1,5-Diaminopentane	NQ	NQ -0.77
Hexylamine	ND	NQ
Histamine	0.32-0.66	0.22-2.03

Table III. Results of triplicate analysis of five white and red wine samples. NQ implies that the compound was not quantified. Amines that could not be detected with this method are denoted as ND. Concentrations in mg l⁻¹.

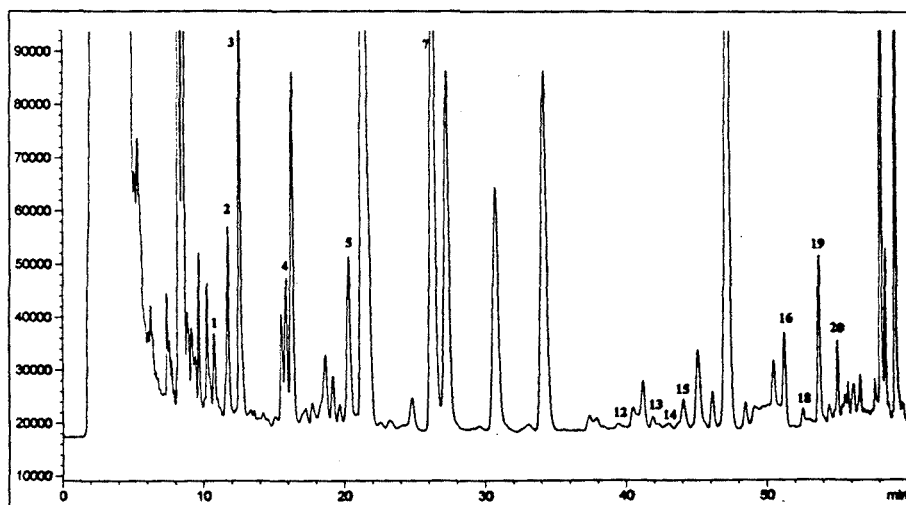


Figure 3. One of the white wines analyzed. Identification numbers can be seen in figures 1 and 2.

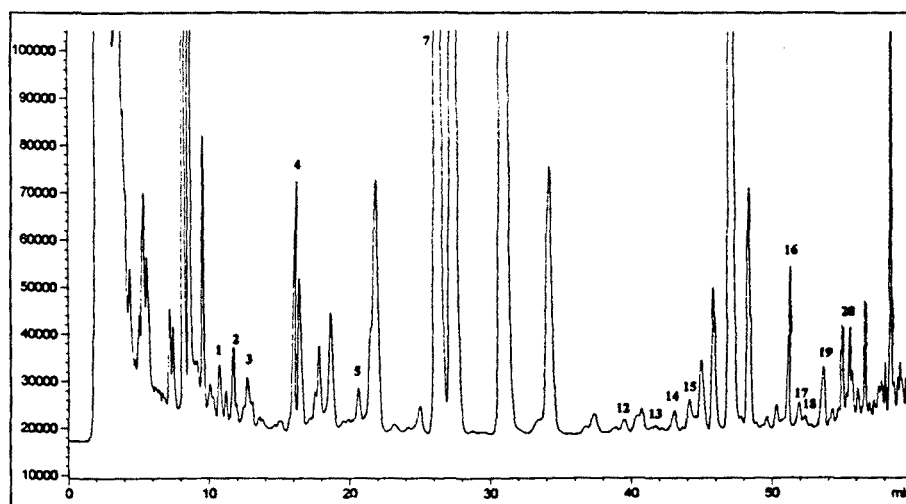


Figure 4. One of the red wines analyzed. Identification numbers are indicated in figures 1 and 2.

In the analysis of white wine a concentration higher than $100 \mu\text{g l}^{-1}$ was obtained for ethanolamine, ammonia, methylamine, ethylamine, morpholine, propylamine, amylamine, 1,4-diaminobutane and histamine. Diethylamine, phenylethylamine, 3-methylbutylamine and 1,5-diaminopentane were identified but not quantified because their concentration were less than the detection limit of the method; the other compounds could not be identified.

When red wine was analyzed, ethanolamine, ammonia, ethylamine, 1,4-diaminobutane and histamine had concentrations close to $100 \mu\text{g l}^{-1}$. As it can be seen in table III, in several samples, methylamine, morpholine, propylamine and 1,5-diaminopentane could not be determined because of their low concentration. Amylamine was not identified in this red wine sample and diethylamine, hexylamine and phenethylamine were identified but not quantified.

The different amine concentrations in white and red wines were compared with the results obtained by Lehtonen with French and Italian wines, where ammonia and methylamine were in higher concentrations in white wines and ethylamine, phenethylamine and putrescine were in higher concentrations in red wines.

In the wines analyzed in this work ammonia, methylamine, morpholine and histamine were clearly higher in white wine while red wine was richer in ethylamine, propylamine, putrescine and cadaverine.

CONCLUSIONS

The developed method appears to be suitable for the detection of a relative large number of amines in wine samples. It involves clean-up with PVP and concentration by SPE in order to determine the low amine concentrations in wine. These are the main advantages over other existing methods which not include treatment with both PVP and SPE in the study of the large number of biogenic amines which can be isolate from wine.

The recoveries were also good when compared to other analytical methods in which LLE is used, mainly for tryptamine, putrescine, cadaverine and histamine. The method was succesfully applied to the analysis of different wines. SPE seems to be an adequate alternative to LLE to determine these compounds in wine samples as it increases the selectivity of the method and provides good recovery for the most important amines which can be present in red and white wines. The method seems also be adequate for oenology laboratory work because of the simplicity of the instrumentation employed.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank the CICYT (Project ALI 90-0890) for their financial support.

REFERENCES

- [1]. W.J. Hurst, J. Liq. Chromatogr., 13, 1 (1990)
- [2]. H.M.L.J. Joosten, C.J. Olieman, J. Chromatogr., 356, 311 (1986)
- [3]. S. Rice, R.R. Eitenmiller, P.E. Koehler, J. Milk Food Technol., 38, 256 (1975)
- [4]. F. Addeo, A. Malorni, Sci. Tecnol. Aliment, IV, 241 (1974)
- [5]. G. Cerutti, Imbottigliamentos, 65 (Nov. 1987)
- [6]. S. Lafon-Lafourcade, A. Joyeux, Connaiss. Vigne Vin, 9, 103 (1975)
- [7]. J.A. Zee, R.E. Simard, L. L'Hereux, J. Tremblay, Am. J. Enol. Vitic. 34, 6 (1983)

- [8]. J.P. Chaytor, B. Crathorne, B.J. Saxby, *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 593 (1975)
- [9]. J.M. Feldman, *Archives of Internal Medicine*; **143**, 2099 (1983)
- [10]. P. Hannah, V. Glover, M. Sandler, *Lancet I*, 879 (1988)
- [11]. G. Karp, *Var-Foeda*, **41**, 454 (1989)
- [12]. C. Tricard, J.M. Cabazeil, M.H. Salagoity, *Analisis M.*, **19**, 53 (1991)
- [13]. Gow-Chin Yen, Trissia Chandra *J. Sci. Food Agric.*, **44**, 273 (1988)
- [14]. M.C. Gennaro, C. Abrigo, *Chromatographia*, **31**, 381 (1991)
- [15]. S. Moret, R. Bartolomeazzi, G.C. Lercker, *J. Chromatogr.*, **284**, 201 (1984)
- [16]. P. Lehtonen, M. Saarinen, M. Vesanto, M. Riekkola, *Z. Lebensm Unters Forsch*, **194**, 434, (1992)
- [17]. R. Battaglia, D. Frölich, *J. High Resol. Chr. & Chr. Commun.*, **2**, 100 (1978)
- [18]. S. Allenmark, S. Mergström, L. Enerbäck, *Analyt. Biochem.*, **144**, 98 (1985)
- [19]. M. Henry, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **24** (1960)
- [20]. C.E. Daudt, C.S. Ough, *Am. J. Enol. Vitic.*, **31**, 356 (1980)
- [21]. G. Cerutti, L. Remondi, *Riv. Vitic. Enol.*, **2**, 66 (1972)
- [22]. N. Seiler, *J. Chromatogr.*, **143**, 221 (1977)
- [23]. C.S. Ough, C.E. Daudt, E.A. Crowell, *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 938 (1981)
- [24]. J.A. Zee, R.E. Simard, A. Roy, *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **14**, 71 (1981)
- [25]. P. Lehtonen, *Z. Lebensm. Unters Forsch*, **183**, 177 (1986)
- [26]. Z Yi, P.R. Brown, *J. Liq. Chromatogr.*, **13**, 2161 (1990)
- [27]. S. Moret, R. Bartolomeazzi, G. Lercker, *J. Chromatogr.*, **591**, 175 (1992)
- [28]. C.S. Ough, C.E. Daudt, *Am. J. Enol. Vitic.*, **32**, 185 (1981)
- [29]. H. Walther, U.P. Schlunegger, F. Friedli, *Biomed. Environ. MS*, **14**, 229 (1987)
- [30]. C. Buteau, C.L. Duitschaeffer, G.C. Ashton, *J. Chromatogr.*, **284**, 201 (1984)
- [31]. É. Solón, J. Paz, J. Wilson, *J. Chromatogr.*, **398**, 381 (1987)
- [32]. A. Sanders, C.S. Ough, *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**, 43 (1985)
- [33]. M. Calull, J. Fabregas, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **32**, 272 (1991)
- [34]. M. Calull, R.M. Marcé, J. Fabregas, F. Borrull, *Chromatographia*, **31**, 133 (1991)
- [35]. R. Boqué, F.X. Rius, *J. Chem. Educ.*, **71**, 230 (1994)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Química



Tesis Doctoral

ESTUDIO SOBRE LA
DETERMINACIÓN DE AMINAS
BIÓGENAS EN VINOS POR *HPLC*

OLGA BUSTO BUSTO

Tarragona, 1996

CAPÍTULO IV

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

Una de las conclusiones más relevantes que se desprenden del capítulo anterior, es que el sistema de *clean-up* por extracción en fase sólida aplicado sobre las dansilamidas permite obtener picos cromatográficos mejor resueltos, lo cual se traduce en una disminución de los LODs del método. Sin embargo, la imposibilidad de eliminar totalmente la presencia de acetona en el medio de reacción, no permite concentrar grandes volúmenes de muestra sin pérdidas importantes de la recuperación de las dansilamidas, por lo que estos límites no disminuyen de la manera deseada.

En este capítulo se describe un método de determinación de 16 aminas biógenas (alternativo al anterior) basado en la cromatografía de sus OPA-derivados. La aplicación del *o*-ftaldialdehído como derivatizante aconseja incorporar un sistema de inyección automática que permita una derivatización *on-line*. Las aminas biógenas mayoritarias se detectan por fluorescencia tras una inyección directa de la muestra. Las minoritarias, por su parte, se concentran en rotavapor después de un proceso de *clean up* realizado por extracción en fase sólida en el que se emplean adsorbentes de carácter iónico (Amberlite GC-50 y DP-1 y SCX).

El desarrollo de la parte experimental de este capítulo se ha planteado siguiendo la misma pauta que en el trabajo anterior: optimización de la separación cromatográfica, de la reacción de derivatización y de la extracción en fase sólida (comparación de los resultados ofrecidos por los tres adsorbentes iónicos propuestos) en el análisis de vinos tintos. Como punto de partida se empleó el trabajo desarrollado por Lehtonen y col. en 1992 [1]. En él se propone un método de derivatización precolumna con OPA para la determinación (por inyección directa de la muestra) de 6 aminas biógenas de interés enológico.

A) OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN

La separación cromatográfica en fases inversas seguida por una detección de fluorescencia constituye un método selectivo, rápido y sensible para la determinación de aminas primarias. El soporte de sílice de la fase estacionaria debe tener el menor número posible de silanoles libres (eliminados mediante un proceso de *end-capping*) para evitar una excesiva retención de las aminas básicas. Este problema hemos constatado que se produce incluso empleando una columna de estas características precedida por una precolumna que no lo era.

La separación siempre se realiza a pH entre 6.0 y 7.5, sobre todo para alargar la vida de la columna analítica, empleando un gradiente de elución. La polaridad del derivado es función del tiol empleado, por lo que es necesario emplear diferentes sistemas de gradiente, p. ej. 20-80% MeOH cuando se emplea mercaptoetanol. Un gradiente a un porcentaje mayor del 50% de ACN es necesario cuando se utiliza ácido 3-mercaptopropiónico.

En esta separación es especialmente importante reservar la zona inicial de elución para los aminoácidos más polares. Esta zona, además, debe quedar suficientemente resuelta dado que el isoindol de la histamina es mucho más polar de lo que lo era el dansilderivado, eluyendo dentro de los primeros 5 minutos de cromatograma.

Respecto a las fases móviles aplicadas, hay que indicar que también se utilizó en trabajo de Lehtonen como punto de partida, pero sustituyendo el ACN por MeOH. El problema más destacable de todos los encontrados fue el ensanchamiento del pico correspondiente al derivado de la histamina, con lo que tuvieron que realizarse diferentes pruebas variando el porcentaje de fase orgánica en la fase móvil e incluso variando el eluyente, sin conseguir

mejoras apreciables. Finalmente, la adición de un modificador orgánico como es la trietanolamina (TEA), ya utilizado en trabajos anteriores con aminoácidos, solventó el problema de la cuantificación de la histamina. No obstante, la adición de trietanolamina a la fase móvil conlleva una serie de inconvenientes entre los cuales cabe destacar el hecho de la imposibilidad de cuantificar etanolamina en las muestras, dado que es uno de los subproductos de descomposición de la trietanolamina (descomposición que, por otro lado, se ha constatado que se produce fácilmente). Además, también se ha constatado una reducción considerable de la vida de la columna analítica.

Los derivados pueden detectarse por UV (absorción máxima 320-340 nm) o preferentemente por fluorescencia, dado que esta detección es más sensible.

B) DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNA ON LINE CON OPA

El o-ftaldialdehído (CAS N° 643-79-8) u OPA reacciona con aminas primarias en medio alcalino y en presencia de mercapto-derivados, proporcionando isoindoles fluorescentes conocidos como OPA-derivados. Puesto que la reacción solamente se da con grupos amino primarios, en muestras de vino se derivatizarán todos los aminoácidos y aminas primarios, pero no la prolina (uno de los aminoácidos mayoritarios en el vino) por lo que se evita esta potencial e importante interferencia. La reacción es rápida y específica a temperatura ambiente. Aunque la bibliografía indica que el proceso empleado originalmente fue el de la derivatización postcolumna, actualmente es el de derivatización precolumna el que ha ganado mayor número de adeptos.

En contraste con lo que ocurre con los derivados del DnsCl, la vida de los OPA-derivados es realmente limitada, cumpliéndose el aserto “velocidades de reacción más elevadas, conllevan reacciones de hidrólisis más rápidas” (entre 6 y 60 min a pH 4.0-6.0) [2]. Esta inestabilidad de los OPA-derivados provoca frecuentemente problemas de cuantificación que la automatización ayuda a reducir.

La estabilidad de los OPA-derivados es dependiente, entre otras cosas, de la amina en sí y del exceso de OPA, pero sobre todo de la naturaleza del nucleófilo reductor (tiol) utilizado en la reacción de ciclación. Aunque, por nuestra experiencia, el tiol no es imprescindible para inducir fluorescencia en las aminas (sí en los aminoácidos), la extraordinaria inestabilidad del agente derivatizante en ausencia del mercaptano, hace inviable su uso. Los mercaptanos no polares (etanotiol vs mercaptoetanol) aumentan la vida de los derivados [3], siendo el ácido mercaptopropiónico y el 3-mercaptopropanol los que consiguen los derivados de mayor estabilidad. Una manera de atacar el problema de la inestabilidad de los OPA-derivados es, por tanto, emplear diferentes nucleófilos aunque hay algunos autores que prefieren variar el medio de reacción una vez efectuada la misma. Como nucleófilos más utilizados cabe destacar, además del etanotiol empleado

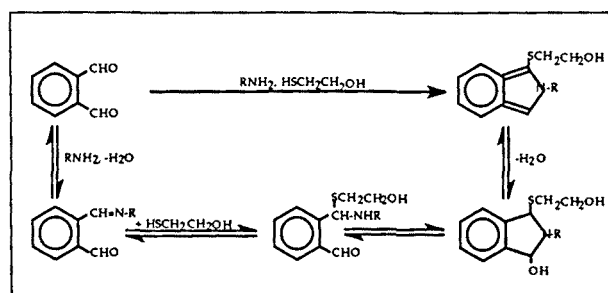


Figura IV.1. Reacción de derivatización del OPA/ME con las aminas

inicialmente, el etanoditiol, el propanotiol y el ácido 3-mercaptopropiónico, aunque el mercaptoetanol es el más empleado actualmente. El tiol se incorpora a la estructura del isoindol (figura IV.1), por lo que los OPA-derivados presentan diferencias en sus propiedades de retención y en sus estabildades.

Las aminos se derivatizan por adición de una solución amortiguadora de borato (pH 9.5-10) a una solución metanólica del tiol y el OPA. Dado que el OPA no es estable en soluciones alcalinas y los mercaptanos se oxidan rápidamente en este medio, es necesario preparar las soluciones (en metanol) separadamente y añadirlas sobre la muestra en un orden preestablecido (solución amortiguadora, mercaptano y OPA) para evitar insolubilizaciones. Es importante que el tiol se añada junto al OPA, y en una concentración dos veces superior a la de este último. De acuerdo con nuestra experiencia, el reactivo derivatizante OPA/tiol puede almacenarse en la solución alcalina de borato al menos 24 h sin que ello afecte significativamente a los resultados cuantitativos. Para evitar la oxidación del tiol y del OPA debe, no obstante, evitarse todo contacto con el aire.

Es importante que el pH en el medio de reacción sea alcalino. Por este motivo, siempre hay que asegurarse de que de la mezcla de muestras ácidas con el derivatizante se obtenga el pH básico adecuado. Se ha demostrado [4] que la fluorescencia resultante es entre 10 y 30 veces mayor a pH 9.5 que a pH 6.0, debido probablemente a un aumento del rendimiento de la reacción a pHs fuertemente alcalinos (investigación realizada por derivatización postcolumna).

Las reacciones entre las aminos y el OPA/tiol se producen en un corto espacio de tiempo. Un incremento de los tiempos de reacción se traduce en un ensanchamiento de los picos cromatográficos y en una pérdida de

fluorescencia motivada probablemente por la descomposición de los derivados.

Como consecuencia de la rápida formación y la rápida descomposición de los OPA-derivados, la reproducibilidad cuantitativa es adecuada solamente cuando la derivatización se produce automáticamente y mediante un sistema *on-line* que permita la separación cromatográfica de los analitos inmediatamente después de ser derivatizados bajo unas condiciones perfectamente estipuladas.

Este proceso puede realizarse con un inyector automático, planificando una secuencia que mezcle consecutivamente reactivo y muestra en un *loop* o cámara de mezcla antes de impulsarlo, transcurrido un tiempo de reacción prefijado, a través del sistema cromatográfico.

Estas inyecciones secuenciales se tienen que realizar asegurándose de que cumplen dos requisitos básicos ya descritos: el pH de la solución resultante tiene que ser eminentemente alcalino y la adición del derivatizante sobre la muestra no tiene que provocar ninguna insolubilización. Transcurrido el tiempo programado de reacción, los derivados son arrastrados por la fase móvil hacia la columna analítica.

Nuestro programa de inyección introduce algunas modificaciones sobre el de Lehtonen con el fin de conseguir la máxima automatización del proceso. Así, la adición del patrón interno (heptilamina) la realizamos en el propio inyector, con lo que es obligado alterar el orden de adición de los reactivos para evitar una reacción prioritaria del OPA con la heptilamina o con la muestra. El OPA/ME preparado en la solución de borato/metanol se adiciona de esta manera en último lugar, sin que ello provoque la insolubilización de ninguno de los compuestos.

El tiempo de reacción es una variable poco modelable. Las experiencias realizadas programando diferentes tiempos de reacción (entre 0.5 y 5 minutos), permiten llegar a la conclusión de que un tiempo de derivatización superior a 1-2 min no solamente se traduce en un alargamiento innecesario del tiempo de análisis, sino que provoca la disminución de las áreas correspondientes a los picos cromatográficos.

C) OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La imposibilidad de trabajar con los derivados en las técnicas de *clean-up* de la muestra efectuadas para mejorar la sensibilidad del método, hizo necesaria la búsqueda de sistemas de extracción en fase sólida diferentes de los indicados en el tercer capítulo.

Amberlite CG-50

La bibliografía recoge algunos tratamientos de muestra en los que se emplean resinas de intercambio catiónico basadas en grupos carboxílicos [5]. Estos grupos permiten la retención selectiva de los grupos amino al pH ácido del vino. La más empleada de estas resinas es la Amberlite CG-50 (CAS N° 9042-11-9), aunque existen otras con la misma funcionalidad.

El inconveniente más importante de la utilización de estas resinas es que su proceso de acondicionamiento es bastante largo. Como contrapartida, presentan buenos resultados de recuperación en el proceso de *clean-up*.

Convenientemente activadas permiten eliminar los polifenoles, los sacáridos y algunos aminoácidos, manteniendo adsorbidas las aminas. La elución se realiza con un volumen de HCl 1M igual al del vino pasado a través de la

resina acondicionada, porque se ha comprobado la imposibilidad de utilizar este proceso como técnica simultánea de preconcentración.

Amberlite DP-1

La Amberlite DP-1 (CAS N° 64333-21-7) también es una resina de intercambio catiónico basada en grupos carboxílicos, pero mientras que la primera comercialmente está en forma protonada, la segunda lo está en forma sódica.

Se pensó inicialmente en la posibilidad de que la Amberlite DP-1 pudiera sustituir a la tradicional CG-50 puesto que ésta, tras el proceso de acondicionamiento, también se convierte en la forma sódica. El tratamiento aplicado coincide exactamente con el de la anterior, pero los resultados son poco satisfactorios, tal vez debido a su menor área superficial.

CBA

Otra de las posibilidades estudiadas fue la de sustituir estas resinas, preparadas (en el caso de la DP-1) y acondicionadas (en el caso de la CG-50) de forma manual y muy laboriosa, por cartuchos comerciales de grupos intercambiadores iónicos débiles como son los CBA (grupos carboxílicos sobre sílice).

Los resultados, no obstante, lejos de mejorar los obtenidos en las anteriores experiencias, demostraban que este tipo de cartuchos retienen difícilmente las aminas biógenas en muestras de vino, detectándose importantes pérdidas de analitos trabajando con volúmenes de muestra del orden de 1 ml o inferior.

SCX

Con el ánimo de automatizar al máximo el proceso, se procedió entonces a aplicar cartuchos comerciales de grupos intercambiadores iónicos fuertes, dado que los anteriores habían demostrado dificultad de adsorción de los analitos. Estos cartuchos fueron los SCX (grupos bencenosulfónicos sobre sílice).

Las primeras pruebas se orientaron hacia la reproducción de las condiciones optimizadas para la Amberlite CG-50, aunque se vio que era necesario dotar de cierta fuerza elutrópica al eluyente añadiendo un porcentaje de MeOH al mismo. Este porcentaje de fase orgánica se optimizó manteniendo la concentración de HCl en 1M.

En las figuras se indican gráficamente los tratamientos descritos para la Amberlite CG-50, la Amberlite DP-1 (figura IV.2) y los cartuchos SCX (figura IV.3). Los detalles de la optimización, así como los resultados obtenidos, se incluyen en el artículo que se anexa y que se publicó en la revista *Chromatographia*.

El método finalmente propuesto se aplicó a la determinación de las aminas biógenas analizadas en 13 vinos tintos de la D.O. Tarragona. De los resultados obtenidos se desprende que la putrescina (cuantificada por inyección directa) y la histamina son las aminas que aparecen generalmente en mayor concentración, aunque algunas muestras presentan contenidos anormalmente altos de otras. Cabe destacar, por otro lado que, de las 16 aminas propuestas inicialmente en el trabajo, solamente 7 fueron detectadas en las muestras de vino.

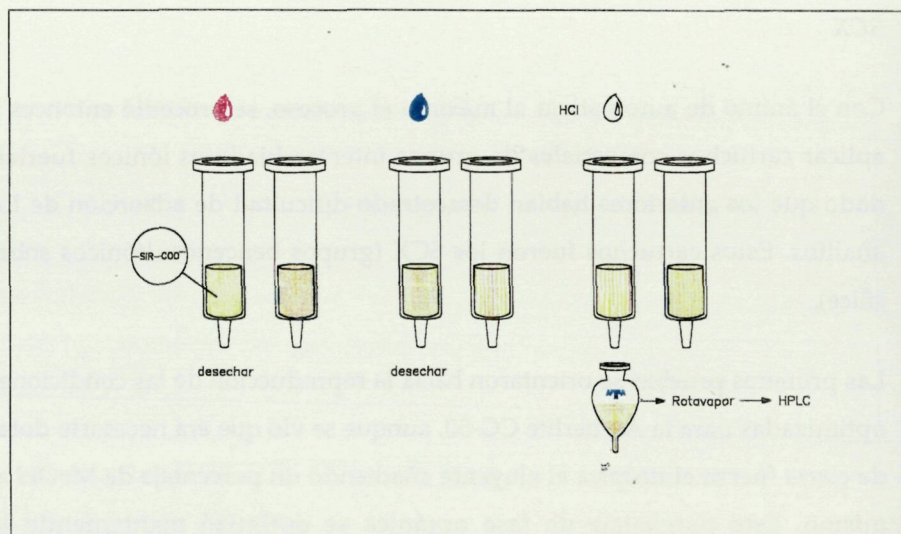


Figura IV.2. Esquema del tratamiento de *clean up* y concentración aplicado en la parte experimental de este capítulo. La muestra pasa a través de un cartucho acondicionado de Amberlite CG-50 o DP-1 (ambos procesos son equivalentes) y se eluye con HCl 1M (método tradicional). La concentración se realiza en rotavapor a vacío.

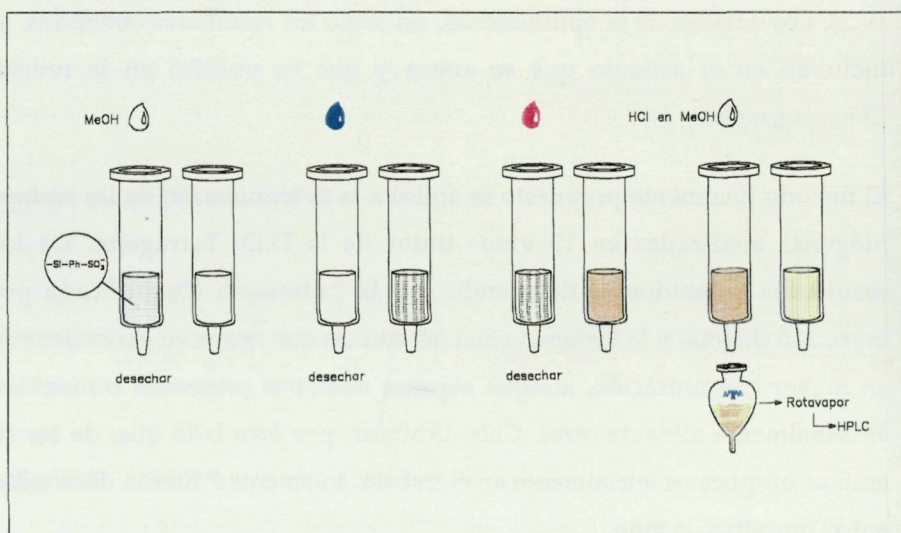


Figura IV.3. Esquema del tratamiento de *clean up* y concentración aplicado en la parte experimental de este capítulo. La muestra pasa a través de un cartucho de SCX activado y acondicionado. Después se eluye con HCl 1M en $MeOH$. La concentración se realiza en rotavapor a vacío.

D) CONCLUSIONES

El método OPA es el más empleado en la determinación de aminas biógenas en vinos, ya que es un método muy selectivo cuando se utiliza un detector de fluorescencia [6]. Sin embargo, también presenta una serie de inconvenientes: solamente es posible la detección de aminas biógenas primarias y los derivados formados tienen que ser analizados inmediatamente, dado que son muy inestables. Otro problema que presenta el método OPA es que la separación cromatográfica se realiza a pH ligeramente básico, hecho que limita la vida de la columna de base sílice que se utiliza habitualmente en esta separación.

Con todo, el OPA es el reactivo derivatizante más utilizado por su rapidez de reacción y su gran sensibilidad. La inestabilidad de los derivados puede soslayarse con la utilización de inyectoras automáticas donde la derivatización tiene lugar en el propio bloque de inyección.

No es posible aplicar, como sería deseable, una extracción postderivatización sobre los OPA-derivados por su inestabilidad. Puede recurrirse a la SPE de las aminas biógenas que permite mejorar el LOD del método si se aplica un proceso de concentración posterior. Tanto la Amberlite CG-50 como los SCX se muestran efectivos como adsorbentes iónicos de las aminas, aunque estos últimos retienen irreversiblemente un alto porcentaje de cadaverina y putrescina.

Seguidamente se incluye el artículo referenciado anteriormente. Hay que reseñar que el procedimiento de derivatización empleado en este estudio es semejante al propuesto por Bertrand para cuantificar 8 aminas biógenas en vinos y que fue publicado (por la OIV) como procedimiento estándar de validación de un método analítico, durante la revisión de este trabajo [7].

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. P. Lehtonen, M. Saarinen, M. Vesanto y M. Riekkola. *Z Lebensm -Untersch -Forsch* 194:434 (1992)
- [2]. M.W. Dong, J.I. DiCesare y M. Steinwand. Perkin Elmer Series. *Angew. Chromatographie* 42 (1985)
- [3]. H. Engelhardt. *Practice of High Performance Liquid Chromatography*. pp 410-425. Springer Verlag. Berlin Heidelberg. New York (1986)
- [4]. M. Roth. *Anal. Chem* 43:880 (1971)
- [5]. A. Ibe, K. Saito, M. Nakazato, Y. Kikuchi, K. Fujinuma y T. Nishima. *J Assoc Off Anal Chem* 74:695 (1991)
- [6]. W.H. Hurst. *J Liq Chromatogr* 13:1 (1990)
- [7]. M.J. Pereira y A. Bertrand. *Bull OIV* 765-766:918 (1994)

CHROMATOGRAPHIA

Chromatographia, 40 (1995) 404-410

DETERMINATION OF BIOGENIC AMINES IN WINE AFTER CLEAN UP BY SOLID-PHASE EXTRACTION

O. Busto^a, M. Mestres^a, J. Guasch^a and F. Borrull^b

^aDepartament de Química, Escola d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Avda. Ramón y Cajal, 70
43005 Tarragona, Spain

^bDepartament de Química, Facultat de Química, Universitat Rovira i Virgili, Pça. Imperial Tàrraco, 1
43005 Tarragona, Spain

Received: Oct 13, 1994
Revised manuscript received: Jan 2, 1995
Accepted: Feb 14, 1995

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

DETERMINATION OF BIOGENIC AMINES IN WINE AFTER CLEAN-UP BY SOLID-PHASE EXTRACTION

Key Words: Column liquid chromatography, Solid-phase extraction,
Wine, Biogenic amines, o-Phthalaldehyde

SUMMARY

A suitable method for the determination of 16 biogenic amines in wine has been developed. The method involves clean-up of wine samples using ion-exchange cartridges and a preconcentration step, under controlled vacuum, before derivatization of the amines by treatment with o-phthalaldehyde (OPA) and reversed-phase HPLC with gradient elution and fluorimetric detection.

Linearity of response was obtained for all the biogenic amines from $100 \mu\text{g l}^{-1}$ to 10 mg l^{-1} . Limits of detection for the amines were similar for all OPA-derivatives ($25\text{-}50 \mu\text{g l}^{-1}$) and the quantitation limits were about 0.1 mg l^{-1} . After clean-up and preconcentration, the concentration levels increased 10-fold for all amines except putrescine and cadaverine, which gave poor recovery by this method unlike the rest which gave recoveries of almost 90%. The overall process was successfully applied to identify and quantify biogenic amines in several red wines from the Tarragona region.

INTRODUCTION

It has been known since 1954 that biogenic amines are naturally occurring compounds in various food products, such as fish, cheese, wine and fermented sausages [1, 2].

There is a great diversity of these amines in food and beverages [3-6], their content being studied because of their direct and indirect potential toxicity.

The interaction between ethanol (a monoamine oxidase inhibitor) and amines seems to be synergistic, which is important for those wine consumers who are sensitive to such compounds.

Among other biogenic amines, tyramine, isoamylamine, tryptamine and 2-phenethylamine produce hypertensive effects; cadaverine and putrescine enhance the anaphylactic activity and toxicity of histamine by simultaneous oral administration [7]. It is still not fully known how other amines interact with each other.

All analytical methods employed for biogenic amines involve two steps: isolation and determination. In the former, problems may appear arising from their different chemical structures. In that case it is necessary to find a middle course in order to obtain adequate recovery for each amine.

The determination and concentration of amines in wine have been reported by several investigators: Subden [7], Vidal [8], Cerutti [5], Baucom [9], Zappavigna [10] and Frölich [11], whose work includes a step to increase the selectivity thus lowering the detection limit of the methods. As can be imagined, direct determination of these compounds in wine is difficult due to their low concentration and the complexity of the wine matrix. Hence it is necessary prior to determining concentration levels of biogenic amines in wine, to undertake clean- up and preconcentration.

In order to isolate compounds of interest, liquid-liquid extraction (LLE) was investigated using different mixtures of organic solvents prior to derivatization of the sample and therefore avoiding troubles with selectivity. Some investigators carry out this extraction procedure after the derivatization process, improving selectivity but not recovery. As indicated in a previous paper [12], these LLE procedures often result in very low

analytical recoveries. Furthermore, when OPA-derivatives are synthesized it is necessary to take into account their stability.

A highly promising approach is preconcentration of the compounds of interest on suitable adsorbents, prior to their separation and detection by a chromatographic technique, mainly when OPA-method has been chosen as derivatisation method on account of their low stability as noted previously.

C18 bonded-silica cartridges are widely applied for the trace enrichment of many non-polar and moderately polar solutes from wine samples. C18 silica is unsuitable for efficient preconcentration of highly polar compounds cation-exchangers being more effective in these cases.

Ion-exchange clean-up with carboxylic acid cation-exchanger has mostly been used but, according to Gawdzik and Czerwinska-Bil [13], resin-based, sulfonic acid cation-exchangers are highly effective for biogenic amines preconcentration.

The aim of this work is to investigate the effectiveness of solid-phase extraction with cartridges of the two kinds of resin-based cation-exchanger mentioned. Amberlite CG-50 has been the resin most frequently used to isolate amines from wine [14-16] but application of this treatment to columns is tedious and time-consuming. Even so, this exchanger would seem to be the more selective [13]. Both resins are therefore examined for determining the levels of biogenic amines in wine.

EXPERIMENTAL

Equipment

Chromatographic experiments were performed using a Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany) 1050 liquid chromatograph with fluorescence detector, Hewlett-Packard model 1046A at 330 and 445 nm as excitation and emission wavelengths, respectively. Derivatization and injection of the samples were carried out by Hewlett-Packard automatic injector, Series 1050. Separation was at 60°C using a thermostated Spherisorb ODS-2 cartridge (250 x 4.6 mm i.d., particle size 5 µm) from Hewlett-Packard. Chromatographic data were collected and recorded in a Hewlett-Packard ChemStation version A.01.01.

Reagents and Standards

The amines studied were: (1) histamine, (2) methylamine, (3) tyramine, (4) ethylamine, (5) i-propylamine, (6) propylamine, (7) tryptamine, (8) i-butylamine, (9) butylamine, (10) phenethylamine, (11) putrescine, (12) 2-methylbutylamine, (13) 3-methylbutylamine, (14) amylamine, (15) cadaverine and (16) hexylamine, all from Aldrich-Chemie (Beerse, Belgium). An individual standard solution of each amine was prepared in HPLC-grade methanol (Scharlau Barcelona, Spain) and stored in darkness at 4°C; the concentration of each solution was about 2 g l⁻¹. A standard solution of each of the listed amines was prepared with an aliquot of each solution by diluting with methanol in a volumetric flask. More diluted solutions used in the various studies were prepared by diluting this standard solution with

Milli-Q quality water. Heptylamine (99%, Aldrich) was chosen as internal standard according to a previous study [17].

Derivatization: 45 mg o-phthalaldehyde (Aldrich; purity 99%) was dissolved in 1 ml methanol and 0.2 ml mercaptoethanol was added to obtain the derivative reagent. The overall solution was brought to a volume of 10 ml with a buffer solution of sodium tetraborate (3.81 g in 100 ml distilled water adjusted to pH 10.5 with 10M sodium hydroxide) prepared in order to adjust the pH of the sample. The derivative solution was prepared daily. The complete derivatization process was automated using the injector programme of the HP-1050.

Chromatographic method: For the chromatographic separation HPLC-grade methanol and tetrahydrofuran (Scharlau) and Milli-Q (Millipore Corporation Bedford, USA) quality water filtered through a 0.45 µm nylon membrane (MSI, Scharlau) were used as mobile phases. Triethanolamine (Merck -Darmstadt, Germany) as modifier for the mobile phase was also used.

Two solvent reservoirs containing the following eluents: (A) 1% tetrahydrofuran (THF) and 0.03% triethanolamine in water and (B) methanol, were used to separate the various amines with an elution program which began with 60% methanol finishing 25 min later with 80% of the same solvent. The program had three additional minutes at the end to reach the initial conditions and the corresponding mobile phase stabilisation. Determination was at flow-rate of 1 ml min⁻¹ and the eluted OPA-derivatives were detected by their fluorescence at 445 nm (330 nm excitation wavelength). Under these conditions all amines studied were eluted in less than 25 minutes without any interference from amino acids.

The temperature was fixed at 60°C since it was demonstrated that it had no influence in the derivative stabilities and substantially reduces analysis time.

Clean-up and concentration: For the solid-phase extraction three acidic cation-exchangers were tried: SCX cartridges (500 mg, Varian Harbor City, USA), Amberlite CG 50 (100-200 wet mesh, Sigma St. Louis, USA) in H-form and then activated with NaOH to convert to the Na form and Amberlite DP-1 (Na form, 16-50 wet mesh, Sigma).

SCX cartridges were conditioned by rinsing them with two volumes of methanol and one volume of Milli-Q water. Samples were applied through the cartridge which was then washed with Milli-Q water. Elution was by 1M HCl in methanol.

Home-made CG 50 cartridges were used in this study: 5 g Amberlite CG 50 were weight and washed with Milli-Q water, 5 ml 10M NaOH were added (pH 9) and left in contact with the resin for 30 min. After rinsing with water three times, 15 ml of 5M HCl were added to a pH of 2. The resin was washed again and mixed with 5 ml 10M NaOH (pH 7.5) and then washed with one volume of buffer solution (Crison Barcelona, Spain), pH 7. Sample was applied through the conditioned resin, washed with Milli-Q water and eluted with 1M HCl. This procedure is an adaptation of a previous one developed by Vidal-Carou [18].

Home made Amberlite DP-1 cartridges were also washed with Milli-Q water, the sample applied, washed with water and eluted with 1M HCl.

When the sample was eluted from the different cartridges, solvent was evaporated under vacuum at room temperature (if the temperature rises general loss of amines is detected) using a rotary evaporator up to a final

volume of 1 ml. The high organic content of wine matrix prevents direct application of this procedure.

In all cases, concentrated samples were put in vials, introduced into the HP-1050 injector and automatically OPA-derivatized.

Sample preparation

Previous solid-phase extraction filtration of the wine sample through a 0.45 μm membrane is recommended. In some cases (i.e. analysis of putrescine and cadaverine), it was necessary to carry out the analysis of the sample without clean-up, solid-phase extraction. In this case, only the indicated sample filtration is done.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the chromatogram of the standard solution of 1 mg l⁻¹ amines after automatic derivatization with OPA. It can be seen that it is possible to separate all the biogenic amines studied with good resolution in less than 25 min.

The derivatization process was fully automated using an injector program. Within one injection sequence, different volumes of sample and reagents were taken from different vials. A fixed volume of internal standard was also taken and added inside the injection capillary. Mixing was enhanced by moving sample, internal standard and reagent volumes back and forth.

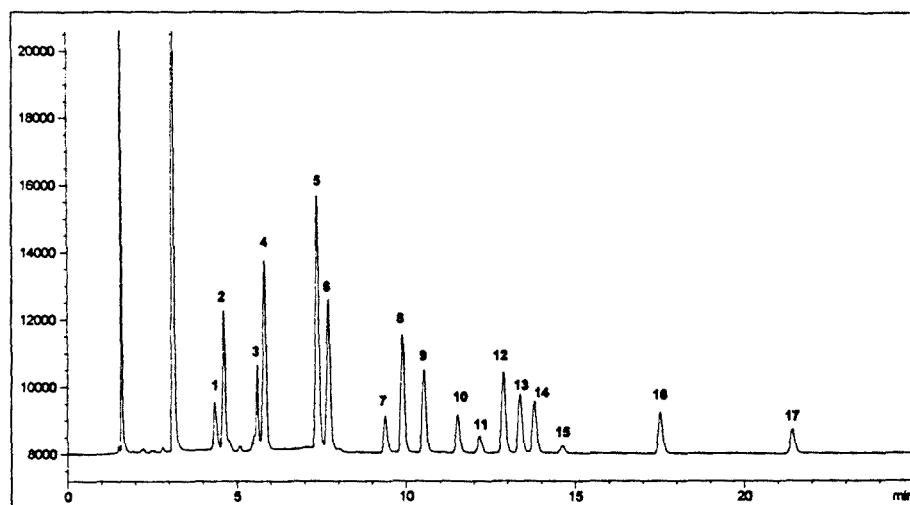


Figure 1.- Standard of 1 mg l⁻¹ of biogenic amines after derivatization with OPA. 1: histamine, 2: methylamine, 3: tyramine, 4: ethylamine, 5: i-propylamine, 6: propylamine, 7: tryptamine, 8: i-butylamine, 9: butylamine, 10: phenethylamine, 11: putrescine, 12: 2-methylbutylamine, 13: 3-methylbutylamine, 14: amylamine, 15: cadaverine, 16: hexylamine and 17: heptylamine (ISTD)

Amine	Range of linearity	Slope	Intercept	(r ²)
Histamine	0.21-10.68	1.1091	-0.0288	1.000
Methylamine	0.05-11.14	5.5220	-0.7921	0.996
Tyramine	0.10-10.22	1.2849	0.0003	0.999
Ethylamine	0.10-13.72	3.7591	0.1080	0.999
i-Propylamine	0.11-10.70	3.2330	-0.4458	0.999
Propylamine	0.12-11.76	3.1322	-0.4648	0.997
Tryptamine	0.11-8.42	1.1141	-1.2578	0.997
i-Butylamine	0.15-10.30	4.1014	-1.5359	1.000
Butylamine	0.10-10.22	2.1069	0.0285	1.000
Phenethylamine	0.10-10.12	1.2086	-0.0402	1.000
Putrescine	0.23-9.36	0.8728	-0.2829	1.000
2-Methylbutylamine	0.11-8.82	2.0149	-0.0065	0.999
3-Methylbutylamine	0.11-11.34	1.7568	-0.0017	0.999
Amylamine	0.12-11.80	1.7391	-0.0602	0.999
Cadaverine	0.09-9.30	0.9972	-0.0370	1.000
Hexylamine	0.11-10.72	1.7044	-0.4388	0.995

Table I. Linearity of fluorimetric detector response at 330 and 445 nm (excitation and emission wavelengths). Concentrations given in mg l⁻¹

To verify the linearity of the fluorescence detector response, at wavelengths previously specified over the working concentration of each amine, standard solutions of amines were prepared and injected. Calibration graphs of each amine were carried out using heptylamine as internal standard [17]. Linear least-squares regression was applied to calculate the slope, intercept and correlation coefficient (r^2) using the statistical software ULC (Univariate Linear Calibration) [19]. In all cases, a good r^2 was obtained. The ranges of linearity shown for different amine concentrations in wines were mostly between 0.1 to 10 mg l⁻¹ (Table I).

The detection limit was calculated from the amount of amine required to give a signal-to-noise ratio of 3 and was found to be between 25 and 50 µg l⁻¹ for the amines studied, and the quantitation limit was about 0.1 mg l⁻¹ for all the amines and was fixed as the first point in the calibration graphs.

Solid-phase extraction was tested as an alternative to LLE, in order to isolate biogenic amines from wine. With this procedure, it is possible to clean-up the sample and then concentrate the clean sample 10-fold to reach a concentration within the range of linearity established.

Two of the resins tested (Amberlite CG-50 and Amberlite DP-1) were weak acid cation-exchangers (-COOH) while the other (SCX) was a strong acid cation-exchanger (-SO₃H). Cartridges of Amberlites were necessarily home-made with polypropylene syringes and polyethylene frits. SCX cartridges are commercially available in different sizes.

Home-made cartridges (4.0 cm x 1.0 cm i.d.) of Amberlite CG-50 were activated and then connected to a vacuum manifold. Two variables were optimized: volume of sample and volume of HCl needed to elute amines from cartridges. For this study a red wine was analyzed using the standard

addition technique. An aliquot of this wine was spiked with 1 mg l^{-1} of the amines and recoveries were determined for all experiments done. 5, 10 and 25 ml samples of red wine and the same wine spiked with standard solution were eluted with 5, 10 and 25 ml 1M HCl. Best results were obtained when 10 ml wine were eluted with 10 ml 1M HCl, there were similar results when 5 ml sample were treated but poor recoveries when 25 ml sample were analyzed. At the same time, low recoveries were obtained when only 5 ml HCl were used in the elution of amines and the same when 25 ml were applied. Thus, 10 ml quantities were chosen to decrease the time necessary to reduce the volume to 1 ml with the rotary evaporator.

The same was done with Amberlite DP-1, the best conditions being 10 ml of sample eluted with 10 ml 1M HCl. Nevertheless, recoveries were always worse than those obtained with Amberlite CG-50, acceptable recoveries only being obtained for propylamine (70%).

Conditioned SCX cartridges were connected to the same vacuum manifold and subsequently 5, 10 and 25 ml of wine samples eluted with 5 and 10 of 1M HCl and 10 ml of different mixtures of MeOH-HCl. The addition of MeOH as a mobile phase organic modifier increases recovery. Best results were obtained when 1M HCl in 95% methanol was used to elute the compounds.

In all cases, to obtain a low detection limit for the method, 10 ml HCl with amines were concentrated with a rotary evaporator at room temperature to 1 ml and then transferred to the autoinjector for automatic derivatization. If small volumes (about $500 \mu\text{l}$) were required, recoveries would decrease because it is difficult to dissolve all the residue. All the results are in Table II.

	Amberlite CG-50		Amberlite DP-1		SCX					
	10 ml HCl 1N		10 ml HCl 1N		10 ml HCl 1N		10 ml HCl- MeOH 50%		10 ml HCl- MeOH 95%	
	% R	r.s.d.	% R	r.s.d.	% R	r.s.d.	% R	r.s.d.	% R	r.s.d.
Histamine	99	4.4	< 10	-	77	4.9	90	4.3	102	4.2
Methylamine	31	9.3	< 10	-	27	8.0	53	7.9	110	5.2
Tyramine	104	4.6	16	8.3	53	7.5	78	5.5	85	5.4
Ethylamine	75	6.8	< 10	-	50	6.0	62	7.1	75	6.9
i-Propylamine	94	4.2	15	8.9	80	3.1	83	4.7	92	5.9
Propylamine	97	5.1	70	5.5	70	4.3	75	4.8	87	5.2
Tryptamine	36	7.7	< 10	-	20	7.9	49	7.4	75	6.7
i-Butylamine	85	4.8	15	11.1	23	7.0	47	6.2	76	6.2
Butylamine	81	4.2	12	13.2	21	6.3	42	6.9	73	6.0
Phenethylamine	75	6.0	17	10.2	12	8.9	52	7.7	96	5.9
Putrescine	94	4.5	11	8.7	15	7.8	26	9.0	35	7.3
2-Methylbutylamine	101	4.4	37	9.4	44	6.2	80	4.9	95	4.5
3-Methylbutylamine	77	5.7	19	8.6	43	6.3	56	5.8	72	6.4
Amylamine	87	5.5	15	7.4	30	7.5	70	4.2	89	5.5
Cadaverine	87	4.3	24	7.8	< 10	-	< 10	-	< 10	-
Hexylamine	59	8.2	30	6.5	40	5.4	60	5.3	93	4.1

Table II. Percentage recoveries with acidic cation-exchangers (R & r.s.d. in %). Results from triplicate analysis of 10 ml red wine sample spiked with 1 ppm amines indicated. Conditions in text. When changing % MeOH in SCX elutions ionic strength remains constant.

Using Amberlite CG-50 only tryptamine and methylamine gave low recoveries (above 30-40%) and hexylamine near 60%, the remaining compounds have recoveries > 75%. The low value for tryptamine was caused by degradation during column clean-up, because it is thought that it is stable in 1M HCl for at last 1 week. In all cases, the relative standard deviation is < 10%.

When DP-1 was used, low recoveries for all compounds were obtained. Two additions of 5 + 5 ml eluent and addition of organic solvent were tried but better results were not obtained.

With SCX, bad recoveries were obtained by elution with 10 ml 1M HCl although an increase of these values was obtained by addition of MeOH.

Best results were when 1M HCl was prepared in 95% MeOH. Only putrescine and cadaverine had low recoveries, the rest of the amines had recoveries > 70%.

To analyze a wine sample, this method can be applied for clean-up and concentration, but if it is necessary to determine cadaverine and putrescine, an alternative method is required. Amberlite CG-50 gives good recoveries for these two amines, and with the gradient elution used here it is possible to analyze both by direct injection of the sample because they have sufficiently different retention times from interfering substances. At the same time, it is known that after many successive analyses the peaks of cadaverine and putrescine gradually decrease. The method suggested by Lehtonen [17] to avoid this problem was applied flushing the chromatographic system with 0.0808M acetic acid/acetonitrile (70:30, vol:vol) for 1 h every 10 analyses.

Figure 2 shows the chromatogram obtained with a red wine and the same sample spiked with 1 mg l⁻¹ of the amines studied. In the red wine ten amines can be identified: 3-methylbutylamine, putrescine, ethylamine, phenethylamine, tyramine, methylamine, histamine, 2-methylbutylamine, i-propylamine and propylamine. The first seven could also be quantified whereas 2-methylbutylamine, i-propylamine and propylamine were only identified.

The low concentration of putrescine obtained in the wine sample and the wine spiked with standard solution is caused by its low recovery, but it is possible by direct injection to detect this amine accurately. Cadaverine can also be quantified by direct injection. At its retention time, as it has been said before, no interfering peaks appear.

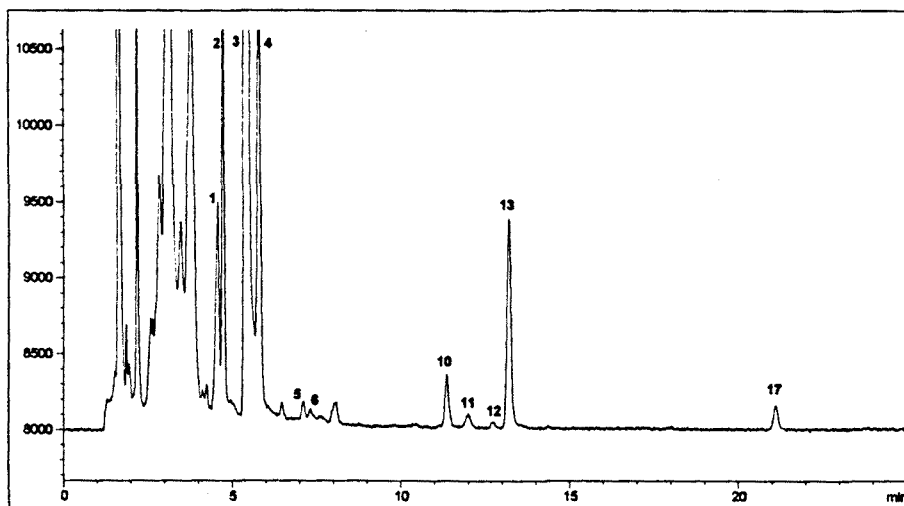


Figure 2a

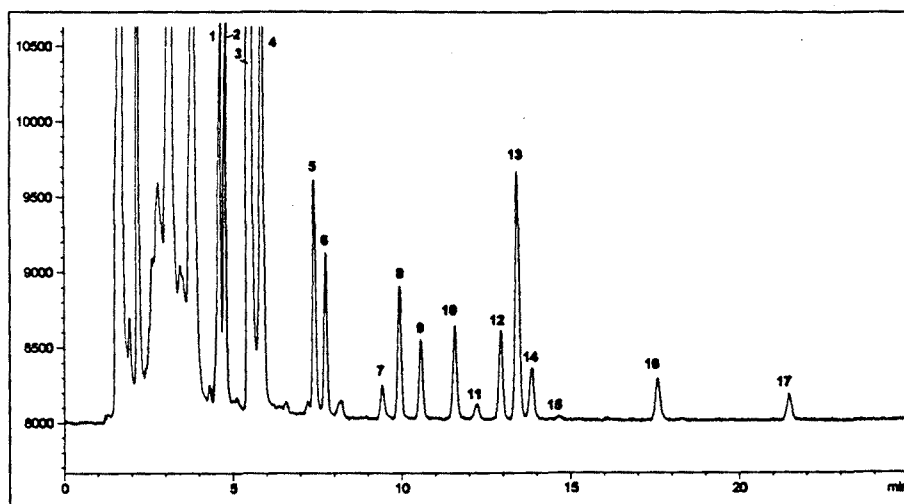


Figure 2.-Chromatogram of red wine and same sample spiked with standard solution final concentration 1 mg l⁻¹ of studied amines: a) red wine and b) red wine spiked with standard solution.

Name	Concentration range (mg l ⁻¹)	Mean value (mg l ⁻¹)
3-Methylbutylamine	0.49-6.14	2.77
Putrescine(*)	1.60-8.08	4.61
Phenethylamine	0.40-2.31	1.17
i-Propylamine	0.15-0.80	0.28
Tyramine	0.73-3.93	2.21
Ethylamine	0.10-4.23	0.71
Histamine	3.25-5.65	3.94

Table IV. Triplicate analysis of 13 red wines.(*) Direct injection

The method has been applied to determine biogenic amines in several commercial red wines from the Tarragona region. Table III shows the results obtained from triplicate analysis of thirteen red wines using SCX Solid Phase Extraction and vacuum concentration, except for putrescine and cadaverine because they remain in the cartridge even if mobile phase is modified as described above. Thus, putrescine and cadaverine were determined by direct injection prior to filtration of the wine.

In all the samples analyzed, histamine is the most abundant amine, with concentrations > 3 mg l⁻¹; the remainder, except i-propylamine, have different concentrations from near their quantitation limit (0.1 mg l⁻¹) to 7 or 8 mg l⁻¹. Only i-propylamine showed levels < 1 mg l⁻¹. Putrescine and cadaverine were analyzed by direct injection, cadaverine could not be identified in the samples studied at concentrations > 25 µg l⁻¹ (identification limit), but putrescine could be identified in all cases at concentrations > 1.6 mg l⁻¹.

CONCLUSIONS

The method developed seems to be suitable for the detection of a relatively large number of amines in wine samples. It involves a clean-up process with cation-exchange resins and concentration by rotary evaporation in order to determine the low amine present in wine at $\mu\text{g l}^{-1}$ level. This is the main advantage over other methods which do not include simultaneous clean up and preconcentration before sample derivatization.

Solid-phase extraction seems to be an adequate alternative to liquid-liquid extraction to determine these compounds in wine samples, increasing the selectivity of the method and obtaining good recoveries for amines present in wines. Only cadaverine and putrescine have low recovery values by this method and they are preferably to be analysed by direct injection.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to thank CICYT (project ALI 90-0890) for financial support given.

REFERENCES

- [1]. J. Schneyder, Bull. de l'O.I.V., **511**, 821 (1973) .
- [2]. S. Moret and R. Bortolomeazzi, J. Chromatogr., **591**, 175 (1992)
- [3]. J.A. Zee, R.E. Simard and L'Hereux, J. Tremblay, Am. J. Enol. Vitic. **34**, 6 (1983)
- [4]. F. Addeo and A. Malorni, Sci. Tecnol. Alimenti, **IV**, 241 (1974)
- [5]. G. Cerutti, Imbottigliamentos, 65 (Nov. 1987)
- [6]. S. Lafon-Lafourcade and A. Joyeux, Connaiss. Vigne Vin, **9**, 103 (1975)
- [7]. R.E. Subden and R.G. Brown, J. Chromatogr. **166**, 310 (1978)
- [8]. M.C. Vidal, A. Ambatlle, M.C. Ulla and A. Mariné, Am. J. Enol. Vitic., **41**, 2, 160 (1990)

- [9]. T. Baucom, M. Tabacchi, T. Cottrell and B. Richmond, *J. of Food Science*, **51**, 5 1376 (1986)
- [10]. R. Zappavigna and G. Cerutti. *Lebens.-Wiss. u. Technol.*, **6**, 4, 151 (1973)
- [11]. D. Frölich and R. Bataglia. *Mitt. Gebiete Lebens. Hyg.* **71**, 38 (1980)
- [12]. O. Busto, Y. Valero, J. Guasch and F. Borrull, *Chromatographia*, **38**, 9/10, 571 (1994)
- [13]. B. Gawdzik and U.Czerwinska-Bil, *Chromatographia*, **32**, 3/4, 167 (1991)
- [14]. K. Saito, M. Horie, N. Nose, K. Nakagomi and H. Nakazawa, *J. Chromatogr.*, **595**, 163 (1992)
- [15]. C. Tejedor and A. Mariné. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* **19** (2), 261 (1979)
- [16]. R.E. Schmitt, J. Haas and R. Amado, *Z. Lebensm. u. Forsch*, **187**, 121 (1988)
- [17]. P. Lehtonen, *Z. Lebensm. Unters Forsch*, **183**, 177 (1986)
- [18]. M.C. Vidal-Carou, Ph. Dr. University of Barcelona, 192 (1987)
- [19]. R. Boqué and F.X. Rius, *J. Chem. Educ.*, **70**, 230 (1993)

CAPÍTULO V

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

La imposibilidad de recuperar cuantitativamente el 1,4-diaminobutano (putrescina) y el 1,5-diaminopentano (cadaverina) mediante *SPE* con adsorbentes sulfónicos, es uno de los graves inconvenientes que tiene el método descrito en el capítulo IV. Otra de sus limitaciones es el hecho de estar obligados a emplear una técnica de concentración adicional (como la evaporación a vacío) para rebajar los *LODs* del método y que solamente es aplicable bajo condiciones estrictamente controladas si se desean obtener resultados satisfactorios. Por otro lado, este proceso resulta difícilmente automatizable.

No obstante, la derivatización automática realizada precolumna con OPA sí se ha confirmado como un método potente y sensible de determinación de aminas primarias, a pesar de la limitación que supone precisamente el hecho de que solamente permita determinar aminas biógenas primarias.

En este quinto capítulo se ha optimizado el método de determinación de aminas biógenas por *HPLC* en fase inversa mediante derivatización precolumna con *o*-ftaldialdehído y detección fluorescente de los derivados.

Asimismo, se ha realizado un estudio de tratamiento de la muestra, alternativo al expuesto en el capítulo precedente, que ha permitido utilizar la extracción en fase sólida como técnica de concentración simultánea al *clean-up* de la matriz, lo cual supone una mejora del método en términos de rapidez y facilidad de automatización.

Para este trabajo se escogió el mismo grupo de aminas analizados en el capítulo IV. No obstante, las modificaciones de fase móvil que discutiremos provocaron la necesidad de suprimir la isobutilamina y la 2-metilbutilamina, dado que prácticamente coeluían con la triptamina y la putrescina respectivamente, impidiendo la correcta cuantificación de éstas. Dada su

menor incidencia en los vinos (no habían aparecido en anteriores análisis), se procedió a suprimirlas de la serie, considerando la posibilidad de recuperarlas si aparecían posteriormente indicios de su presencia.

El procedimiento seguido en el establecimiento del método ha sido semejante al de los otros capítulos, aunque en este caso el proceso de separación y derivatización ha podido simplificarse puesto que se trataba de una readaptación del método propuesto en el capítulo precedente.

A) OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN

Continuando, por tanto, en la línea de la derivatización precolumna con OPA/ME, se introducen algunas modificaciones en la fase móvil que mejoran la composición de la empleada en el anterior trabajo.

Diferentes problemas que afectaban a la vida de la columna y a la estabilidad del equipo (parcialmente solventados mediante el *flushing* recomendado por Lehtonen [1] y aplicado por nosotros en el anterior trabajo), nos llevaron a eliminar la trietanolamina de la fase móvil. Recordemos que este modificador se añade para evitar el ensanchamiento del pico correspondiente al derivado de la histamina, efecto que también se consigue adicionando acetato sódico a la fase móvil.

No obstante, la columna analítica sigue trabajando en condiciones semiextremas dado que se opera a pH ligeramente superior a 7, lo cual conllevará una solubilización lenta pero inexorable de la sílice que sirve de soporte a la columna.

B) ADAPTACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DERIVATIZACIÓN. CUANTIFICACIÓN POR EL MÉTODO DEL PATRÓN EXTERNO

Respecto al sistema de derivatización, también se introducen algunas variaciones con respecto al método propuesto en el capítulo IV. La más importante es que se elimina el patrón interno como método de cuantificación. Esta posibilidad se contempla como consecuencia del sistema de inyección automática que se ha aplicado.

En el mencionado trabajo, la adición de heptilamina (patrón interno) en el *loop* de mezcla iniciaba una secuencia en la que muestra y derivatizante se añadían consecutivamente en el mismo *loop*. De esta manera se aseguraba que todas las aminos se derivatizaran simultáneamente tras una mezcla efectuada en el propio equipo (concretamente en el *loop*) de forma automática. No obstante, a pesar de que se obtienen buenos resultados, la posibilidad de homogeneizar mejor la mezcla, efectuando una adición de derivatizante antes y después de añadir la muestra, nos impulsó a comparar los resultados obtenidos cuantificando con y sin adición secuencial de heptilamina.

Era de preveer que no se obtendrían grandes diferencias, como así corroboró el estudio, dado que la adición del patrón se realiza invariablemente de forma automática. Por tanto, se procedió a la simplificación del sistema propuesto en el capítulo IV eliminando la adición del patrón interno. Así se coincide con trabajos publicados anteriormente por otros autores en este mismo sentido [2].

C) TRATAMIENTO DE LA MUESTRA: LA SPE UTILIZADA SIMULTÁNEAMENTE COMO SISTEMA DE CLEAN-UP Y CONCENTRACIÓN

Respecto al apartado de tratamiento de muestra, también se ha seguido la estrategia de la máxima simplificación del sistema de *clean-up*. Recordemos que trabajando con intercambiadores catiónicos no era posible efectuar un proceso de *clean-up* simultáneo a la concentración de las aminas. Puesto que éstas poseen un carácter iónico al pH del vino, puede aprovecharse esta propiedad para aditivarlas con contraiones que neutralicen su carga, permitiendo concentrarlas mediante cartuchos de C_{18} , de manera semejante a la aplicada en el tercer capítulo. Este procedimiento se ha aplicado satisfactoriamente a la cromatografía en fase inversa (cromatografía de pares iónicos, *IPR-RP-HPLC*) de las aminas ionizadas, así que en principio es adecuado su planteamiento [3-5].

El problema más importante, nuevamente, es la carga polifenólica que nos encontramos en los vinos tintos y que impide el uso de adsorbentes de características apolares en los que quedarían retenidos mayoritariamente. La eliminación de polifenoles puede realizarse mediante la ya discutida adición de PVP (capítulo III) cuyo inconveniente mayor es que es difícilmente automatizable y mediante cartuchos comerciales de C_{18} o de intercambiadores aniónicos fuertes que ofrecen posibilidades interesantes.

El adsorbente de C_{18} permite trabajar con la muestra sin tratar. Al pH ácido del vino, los polifenoles están en la forma adecuada para quedar retenidos. Las aminas, por su parte, están ionizadas y no quedarán retenidas en la fase sólida. Solamente hay que asegurarse de utilizar un cartucho con la suficiente capacidad de adsorción para la cantidad de muestra a tratar.

El intercambiador aniónico, por su parte, precisa de que el vino esté a pH básico. De esta manera las aminas están neutralizadas, mientras que los polifenoles se han convertido en polifenolatos adsorbibles por los grupos amonio soportados sobre la sílice que constituyen los SAX. Los procedimientos de *clean-up* que preceden a la etapa de concentración se esquematizan en las figuras V.1 (C₁₈) y V.2 (SAX).

Para la etapa de concentración se emplean indefectiblemente los cartuchos de C₁₈. Para ello es preceptivo activarlos y acondicionarlos, teniendo la precaución de emplear en su acondicionamiento una solución del par iónico que se añadirá al vino decolorado a un pH adecuado para que se produzca la formación del par. Es importante que el vino esté prácticamente libre de polifenoles porque, de otra manera, éstos quedarían retenidos en el adsorbente preparado para la concentración de las aminas, colapsando los puntos activos del cartucho de extracción, dada su mayor concentración respecto a los analitos de interés.

Los sulfonatos orgánicos, utilizados frecuentemente como contraiones en la cromatografía de pares iónicos, son adecuados para la retención en cartuchos de C₁₈. Especialmente el octanosulfonato, el decanosulfonato y el dodecanosulfonato, ofrecen buenas perspectivas debido a su afinidad por el adsorbente: cuanto mayor sea la cadena carbonada, más eficaz será la adsorción. En el otro extremo, es el grupo sulfonato el que interaccionará electrostáticamente con las aminas, las cuales se mantienen en forma catiónica en un amplio intervalo de pH (2-8).

El octanosulfonato fue el anión escogido para los primeros ensayos puesto que se había utilizado con éxito como contraión en la separación de aminas en cervezas por *IPR-RP-HPLC*. Sobre la base de los resultados obtenidos, se

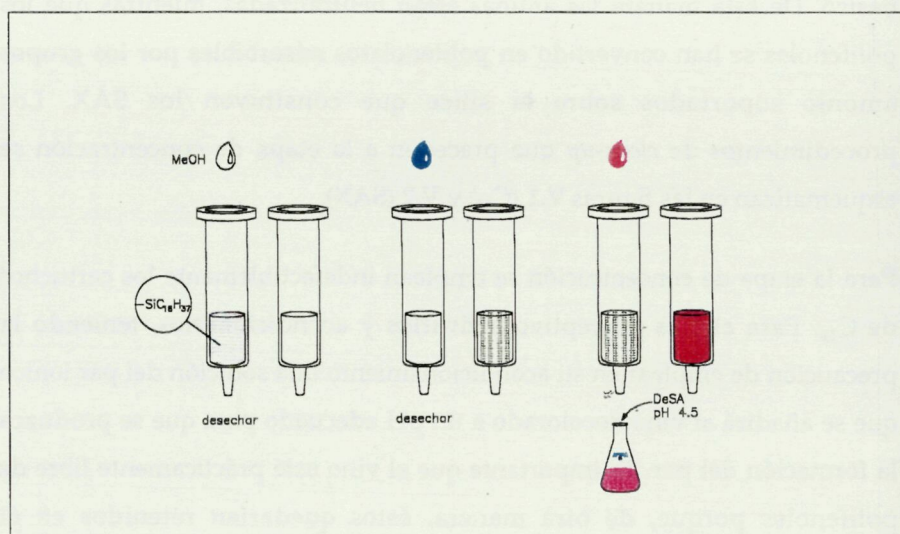


Figura V.1. Esquema del tratamiento de *clean up* con C_{18} aplicado en la parte experimental de este capítulo. La muestra pasa a través de un cartucho activado con $MeOH$ y acondicionado con agua.

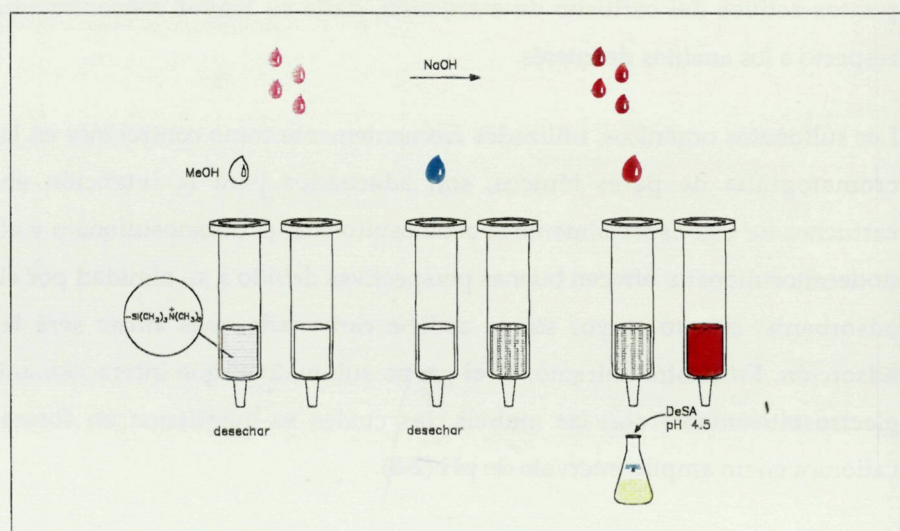


Figura V.2. Esquema del tratamiento de *clean up* con SAX aplicado en la parte experimental de este capítulo. La muestra alcalinizada con $NaOH$ pasa a través de un cartucho activado con $MeOH$ y acondicionado con agua.

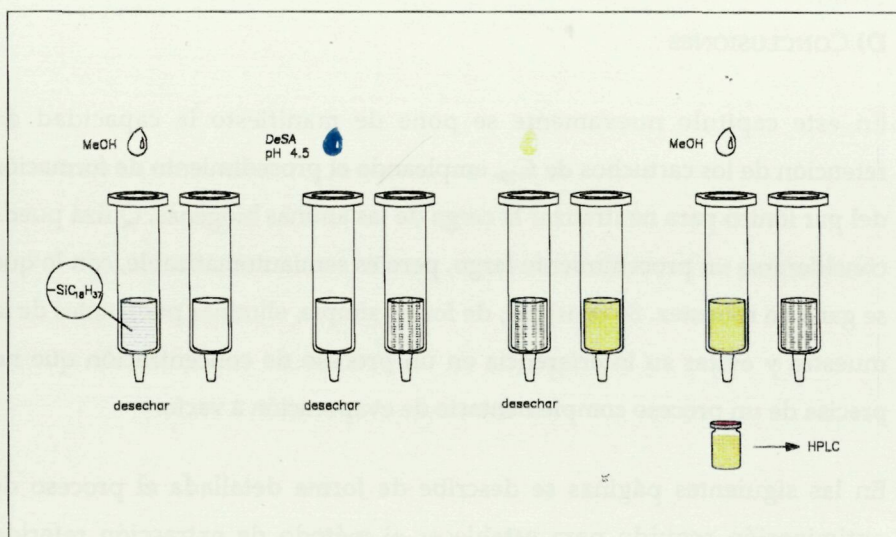


Figura V.3. Esquema del proceso de concentración con C_{18} aplicado en la parte experimental de este capítulo. La muestra pasa a través de un cartucho activado con MeOH y acondicionado con el IPR a pH 4.5. Finalmente, las aminas se eluyen con MeOH.

compararon diferentes eluyentes del par adsorbido sobre el cartucho de C_{18} y distintos pHs, contraiones y volúmenes de muestra, con el fin de rebajar los límites de detección del método. En la figura V.3 se indica el procedimiento general empleado en la concentración del vino decolorado.

Cabe destacar que también se trató de utilizar fases poliméricas de *PLRP-S* para retener las aminas, con y sin adición de par iónico. Estos resultados no se han incluido en el trabajo porque no ofrecían buenas perspectivas: las aminas quedaban retenidas irreversiblemente en el cartucho preparado.

Nuevamente, el método optimizado se aplicó al análisis de diferentes muestras de vino tinto D.O. Tarragona, apareciendo en todas ellas etanolamina, tiramina, putrescina e histamina (esta última sólo tras efectuar el tratamiento de *SPE*). El resto de aminas aparecieron de forma esporádica.

D) CONCLUSIONES

En este capítulo nuevamente se pone de manifiesto la capacidad de retención de los cartuchos de C_{18} , empleando el procedimiento de formación del par iónico para neutralizar la carga de las aminas biógenas. Quizá puede considerarse un procedimiento largo, pero es semiautomatizable, con lo que se gana en robustez. Se consigue, de forma simple, eliminar polifenoles de la muestra y evitar su interferencia en un proceso de concentración que no precisa de un proceso complementario de evaporación a vacío.

En las siguientes páginas se describe de forma detallada el proceso de optimización seguido para establecer el método de extracción referido anteriormente. El trabajo ha sido publicado en el *Journal of Chromatography* el pasado mes de Diciembre y se está aplicando con éxito en la cuantificación de aminas biógenas (diferentes de las analizadas en este estudio) por investigadores de otros grupos del *Centre de Referència de Tecnologia d'Aliments (CeRTA) de la Generalitat de Catalunya*.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. P. Lehtonen, M. Saarinen, M. Vesanto y M. Riekkola. *Z Lebensm -Unters -Forsch* 194:434 (1992)
- [2]. C. Buteau, C.L. Duitschaever y G. Ashtonf. *J Chromatogr* 184:201 (1984)
- [3]. M.H.L.J. Joosten y C. Olieman. *J Chromatogr* 356:311 (1986)
- [4]. M. Izquierdo, M. Vidal y A. Mariné. *J Assoc Off Anal Chem Internat* 76: 1027 (1993)
- [5]. M.C. Gennaro y C. Abrigo. *Chromatographia* 31:381 (1991)

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

J Chromatogr A, 718 (1995) 309-318

IMPROVEMENT OF A SOLID-PHASE EXTRACTION METHOD FOR DETERMINING BIOGENIC AMINES IN WINES

O. Busto^a, J. Guasch^a and F. Borrull^b

^aDepartament de Química, Escola d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Avda. Ramón y Cajal, 70
43005 Tarragona, Spain

^bDepartament de Química, Facultat de Química, Universitat Rovira i Virgili, Pça. Imperial Tàrraco, 1
43005 Tarragona, Spain

Received: Feb 22, 1995
Revised manuscript received: June 13, 1995
Accepted: June 14, 1995

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

IMPROVEMENT OF A SOLID-PHASE EXTRACTION METHOD FOR DETERMINING BIOGENIC AMINES IN WINES

Key Words: Biogenic amines, wine, o-phthalaldehyde, solid-phase extraction, ion pair reagent

ABSTRACT

Solid-phase extraction (SPE) is used to simultaneously clean up and concentrate samples prior to automatic derivatization to determine 15 biogenic amines in wine. In the first step, SPE is used to remove polyphenolic compounds which interfere with further extraction and chromatographic analysis; in this study, treatments with polyvinylpyrrolidone, SAX and C₁₈ cartridges were tested and compared. In the second step, C₁₈ cartridges were used to concentrate the analytes after adding sodium octanesulfonate, sodium decanesulfonate and sodium dodecanesulfonate as ion pair reagents. Reversed phase chromatography with fluorimetric detection was performed on the extracted amines after automatic precolumn derivatization by treatment with o-phthalaldehyde. Biogenic amines can be separated and detected after the solid-phase extraction with an average sensitivity of the order of 20-90 µg l⁻¹. Recoveries were determined by the standard addition technique and the overall method was successfully applied to the determination of the above-mentioned amines in red wines from the Tarragona region.

INTRODUCTION

Biogenic amines are low-molecular-mass basic compounds that can be found in a variety of fermented foods and beverages, sometimes indicating product spoilage. In wines, amines occur as salts. They are odourless, but with the pH prevailing in the mouth, amines are released and their flavour can be tasted. Moreover, high amine contents, especially histamine, are related to several physiological effects, mainly when alcohol and acetaldehyde are

present, which act as potentiators of toxicity. There is a positive correlation between the concentration of histamine and that of other undesirable biogenic amines, such as tyramine, tryptamine, β -phenethylamine, cadaverine and putrescine in wine.

More than 30 amines have been identified in wine [1-10]: butylamine, cadaverine, tryptamine, ethanolamine, 1,3-diaminopropane, dimethylamine, ethylamine, hexylamine, histamine, indole, iso- and n-propylamine, methylamine, 2- and 3-methylbutylamine, morpholine, iso- and n-pentylamine, β -phenethylamine, piperidine, putrescine, pyrrolidine, 2-pyrrolidone, serotonin, tyramine, etc. Their concentration has been reported to range from a few mg l⁻¹ to about 50 mg l⁻¹ depending on the quality of the wine [11].

Numerous liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in wine have been described, with ion-exchange [2, 12] or reversed-phase columns; with pre- [7, 16-18] or post-column [19] derivative formation and without it [6, 13-15] and with different detection means, mainly ultraviolet [10, 18, 20, 21] or fluorescence [4, 7, 10, 11, 16, 17]. Nevertheless, if biogenic amines are to be determined at low levels with no interference from other compounds, e.g., aminoacids, previous clean-up and preconcentration steps are required.

Numerous methods for isolating amines from wine have been proposed and reported, including either liquid-liquid extraction (LLE) or solid-phase extraction (SPE) procedures. Several researchers, including Almy *et al.* [22], Lehtonen [10] and Moret and Bortolomeazzi [23], who extracted the amines with butanol after preconcentration in a rotary evaporator at pH 1.5, have used LLE before derivatization to isolate biogenic amines. Other workers, such as Walther *et al.* [24] who extracted dansylamides with ethyl acetate

after acetone evaporation under a nitrogen stream, and Buteau *et al.* [6] who extracted five o-phthalaldehydes (OPA) derivatives with ethyl acetate, carried out the extraction after derivatization. Differences in polarity in the former LLE procedures result in low recoveries for some amines, while instability of the OPA derivatives in the latter results in bad reproducibility.

Nowadays, SPE is preferred to LLE because of its obvious advantages, and some studies have been carried out using this method before and after derivatization. However, the method commonly proposed for the determination of biogenic amines in wine (or aqueous samples in general) is based on cation-exchange extraction followed by derivatization of the fraction of interest with OPA [4, 5, 21, 25-29].

In previous work, solid-phase extraction was successfully used to enrich the biogenic amines in wines after derivatization with dansyl chloride (DnsCl) using C₁₈ sorbents [30] or with phenyl isothiocyanate (PITC) using SAX cartridges [21]. It has been demonstrated with phenolic substances in water [31] that the retention capacity of C₁₈ cartridges for polar compounds increases when an ion pair reagent is used, so these ion pairs have been applied to wines.

For the procedure proposed here, several ion pair reagents (octane-, decane- and dodecanesulfonate) were tested in order to improve the SPE recoveries for the determination of food-related biogenic amines. The method was applied to the determination of these compounds in red wines.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

The fifteen amines studied were ethanolamine, histamine, tyramine, ethylamine, i-propylamine, propylamine, methylamine, tryptamine, butylamine, phenethylamine, putrescine, 3-methylbutylamine, amyl-amine, cadaverine and hexylamine, all of which were supplied by Aldrich-Chemie (Beerse, Belgium). An individual standard solution of 2000 mg l⁻¹ of each amine was prepared in HPLC-grade methanol (Scharlau, Barcelona, Spain) and stored in darkness at 4°C. A standard solution containing all the amines was prepared with an aliquot of each solution and subsequently diluted with methanol in a volumetric flask. More diluted solutions used in the different studies were prepared by diluting the standard solutions with water purified in a Milli-Q water apparatus (Millipore, Bedford, MA, USA).

Methanol, acetonitrile and tetrahydrofuran used in the chromatographic and extraction method were of HPLC grade (Scharlau). Sodium acetate (0.05M) buffer solution was also supplied by Scharlau. For the automatic derivatization method OPA and mercaptoethanol (purity 98%) (Aldrich), HPLC-grade acetone (Scharlau) and sodium tetraborate and sodium hydroxide to adjust the pH were used.

Octanesulfonate (OSA), decanesulfonate (DeSA) and dodecanesulfonate (DoSA) sodium salts (Scharlau) were used to form amino-alkylsulfonate neutral pairs.

Equipment

Chromatographic experiments were performed using a Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany) Model 1050 liquid chromatograph with an HP Model 1046A fluorescence detector. The samples were derivatized and injected with an HP Series 1050 automatic injector. Separation was performed using an ODS Basic cartridge (250 x 4.6 mm I.D., particle size 5 μm) preceded by an ODS Basic precolumn, both supplied by Teknokroma (Barcelona, Spain). Chromatographic data were collected and recorded on an HP ChemStation version A.01.01.

SPE experiments were performed using a Visiprep DL disposable liner solid phase extraction vacuum manifold with individual flow control valves from Supelco (Bellefonte, PA, USA) which allowed twelve SPE tubes to be dried at a time.

High-performance liquid chromatographic method

Two solvent reservoirs containing (A) 1% tetrahydrofuran and 0.05M sodium acetate in water and (B) methanol were used to separate all the amines with an HPLC elution programme which began with 55% of methanol in the mobile phase and finished 25 min later with 80% of the same solvent. Finally, the column was cleaned with an isocratic elution at this percentage of methanol for a further 3 min. The programme took a further 2 min to return to the initial conditions and stabilize the corresponding mobile phase. Determination was performed at 60°C with a flow-rate of 1 ml min⁻¹ and the eluted OPA derivatives were detected by monitoring their fluorescence at 330 nm and 445 nm as the wavelengths of

excitation and emission, respectively. Under these conditions all fifteen amines were eluted in less than 20 min.

Derivatization

The derivatization reagent was prepared with 45 mg of OPA, 200 μ l of mercaptoethanol (ME) and 1 ml of methanol, diluted to a total volume of 10 ml with a buffer solution of sodium tetraborate (3.81 g dissolved in 100 ml of distilled water and adjusted to pH 10.5 with 10M sodium hydroxide) so as to adjust the derivatization pH.

The derivatization was fully automated by means of an injector programme. The injection system mixes the reagents automatically. The OPA-ME derivatization reagent and the sample were drawn sequentially into the injection needle and the reactants were mixed by drawing them back and forth in the injection seat. Finally, the mixture is injected into the column and separated using gradient elution. The steps in the derivatization sequence are summarized in Table 1.

Step	Action	Amount	Details	Substance
10	DRAW	2 μ l	AIR	
20	DRAW	5 μ l	from VIAL 2	OPA/ME (derivatizing agent)
30	EJECT	5 μ l	into SEAT	
40	DRAW	0 μ l	from VIAL 1	MeOH for needle wash
50	DRAW	2 μ l	from SAMPLE	
60	EJECT	2 μ l	into SEAT	
70	DRAW	0 μ l	VIAL 1	MeOH for needle wash
80	DRAW	5 μ l	VIAL 2	OPA/ME (derivatizing agent)
90	EJECT	5 μ l	into SEAT	
100	MIX	12 μ l	ten cycles	
110	WAIT	1 min		
120	INJECT			

Table 1. Injection programme for the derivatization of primary amines with OPA

Solid-phase extraction

SPE consisted of 2 steps: the first one removed the polyphenolic compounds and the second removed other polar compounds but retained the amines. Both C_{18} cartridges (1000 mg) (Varian, Harbor City, CA, USA) and SAX (500 mg) (Varian) were used in the first step, and in both cases they were activated with two fractions of 5 ml of methanol, and further conditioned with two fractions of 5 ml of Milli-Q-purified water.

When polyvinylpyrrolidone (PVP) was used to bleach wine, the conditions were the same as those outlined in a previous paper [30].

The second cartridge (C_{18}) was also activated with two fractions of 5 ml of methanol and then conditioned with another two fractions of 5 ml of the ion-pair solution (OSA, DeSA and DoSA) at a pH between 3.5 and 5.5 depending on the experiment. Then, the sample with ion-pair reagent at the established pH was passed through the cartridge. Amines were eluted with a determined volume of organic solvent and automatically derivatized prior to their chromatography.

RESULTS AND DISCUSSION

In a previous study [32], a binary mobile phase formed by a solution of triethanolamine in water and methanol as organic modifier was used to separate biogenic amines after their derivatization with OPA. The efficiency of the column clearly deteriorated after a few injections, revealed by the overlapping of the histamine derivative peak and other initial interfering peaks. It was therefore necessary to regenerate the column with an organic solvent to obtain the initial resolutions. The use of 0.05M acetate buffer

solution (pH 7) allows a different analysis to be carried out with no further column regeneration and with similar efficiency.

Fig 1 shows the chromatogram which resulted from automatically injecting 5 mg l⁻¹ of the fifteen OPA derivatives into the chromatograph under the conditions previously specified. Good resolution was obtained among all the peaks.

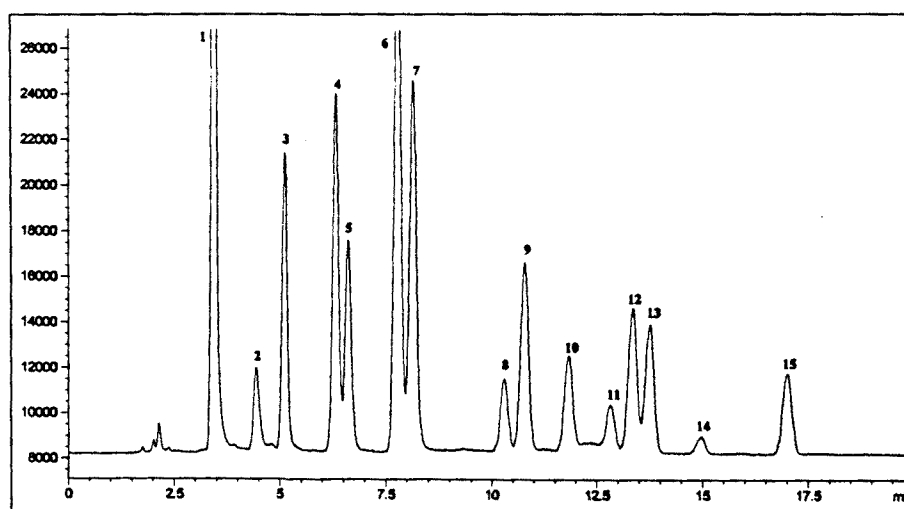


Figure 1. Optimum chromatographic separation of the OPA-amine derivative standard solution of concentration 5 mg l⁻¹. Peaks: : 1: ethanolamine, 2: histamine, 3: methylamine, 4: ethylamine, 5: tyramine, 6: i-propylamine, 7: propylamine, 8: tryptamine, 9: butylamine, 10: phenethylamine, 11: putrescine, 12: 3-methylbutylamine, 13: amylamine, 14: cadaverine and 15: hexylamine.

The precision and linearity of the precolumn derivatization method were examined. According to Buteau *et al.* [6], a comparison between results obtained by analysing samples using either an external or internal standard indicated that there is no significant difference between them. An external standard method was chosen here because it allows samples to be automatically derivatized using the injection programme explained above

and which is more sensitive than the programmes which must involve an internal standard also.

In order to verify the linearity of the response of the different derivatives at the previously specified wavelengths for the working concentration, standard solutions of amines were prepared and injected. Calibration graphs of each amine were constructed by plotting the amine peak area against the amine concentration. Linear least-squares regression was used to calculate the slope, intercept and correlation coefficient which was good in all cases (Table 2).

Amine	Range of linearity (mg l ⁻¹)	Slope	Intercept	r ²
Ethanolamine	0.81-16.11	17381	-1336	1.000
Histamine	0.43-8.54	3326	-3024	0.999
Methylamine	0.22-4.46	12421	-731	1.000
Ethylamine	0.27-5.49	13363	-579	1.000
Tyramine	0.41-8.18	8147	-758	1.000
i-Propylamine	0.43-8.56	20162	226	1.000
Propylamine	0.47-9.41	12329	-584	1.000
Tryptamine	0.42-8.42	3095	-10	1.000
Butylamine	0.41-8.18	8562	-1132	1.000
Phenethylamine	0.40-8.10	4547	-219	1.000
Putrescine	0.94-18.72	1975	1211	0.999
3-Methylbutylamine	0.91-9.07	6825	-284	1.000
Amylamine	0.94-9.44	5369	-90	1.000
Cadaverine	0.74-7.44	871	1068	0.999
Hexylamine	0.86-8.58	4257	-522	1.000

Table 2. Linearity of the fluorimetric detector response at 330 and 445 nm as excitation and emission wavelengths.

The detection limit was calculated from the amount of amine required to give a signal-to-noise ratio of 3 by injecting 1 µl of sample without SPE, and ranged from 0.07 to 0.4 mg l⁻¹, whereas quantification limits ranged from 0.2 to 0.9 mg l⁻¹, depending on the amine. The quantification limit was

established as three times the detection limit and it was considered as the first point in calibration graphs.

Isolating biogenic amines from wine requires polyphenolic compounds to be previously removed because they block the C_{18} cartridge used in SPE, especially when dealing with red wines. In order to perform this bleaching treatment, PVP and two C_{18} and SAX cartridges were tested. In all cases a decolorized wine was obtained with good analyte recoveries. PVP treatment requires time for mixture stirring (1 g of PVP per 25 ml of wine, 15 min) and for filtration, which makes analytical time much too long [30], whereas clean-up with C_{18} or SAX cartridges is easily semi-automated. A 15-ml volume of a red wine spiked with a standard solution of 3 mg l⁻¹ of the biogenic amines was processed with either C_{18} or SAX cartridges. When SAX was used, the sample was necessarily adjusted to pH 8 in order to retain polyphenolic substances which were converted into their respective anionic forms. Table 3 gives the results obtained when all the decolorizing agents were tried. No substantial amounts of amines were lost with any of them, but it was found that an increase in sample volume resulted in a coelution of polyphenols when C_{18} or SAX cartridges were used. As SAX showed the best recoveries, especially for phenethylamine and hexylamine, it was selected as the preliminary clean-up cartridge.

To perform the solid-phase extraction of amines with C_{18} cartridges, several variables were studied: the concentration of the ion-pair reagent, the volume of organic solvent to desorb analytes, the best ion-pair reagent and the volume of concentrated sample.

The volume of organic solvent to desorb amines from C_{18} cartridges was the first step in the optimization of these variables. A 15-ml volume of wine sample spiked with 0.4 mg l^{-1} of standard biogenic amine solution was adjusted to pH 8 and passed through the SAX cartridge to remove polyphenolic and other non-polar compounds. Then $100 \text{ }\mu\text{l}$ of OSA solution [33] as the ion-pair reagent and a volume of 0.05M sodium acetate solution to adjust the pH to 4.5 were added and passed through the activated C_{18} cartridge. Different volumes of methanol were passed through to elute these compounds and the best results were obtained when 3 ml of methanol were used. Poor recoveries were obtained when smaller volumes were used and higher volumes only diluted the sample.

The pH and type of ion-pair reagent were tested in order to improve the recoveries. After the bleaching process, a new C_{18} cartridge was activated with methanol and the corresponding ion-pair reagent solution was adjusted to pH 3.5, 4.5 or 5.5, depending on the experiment. pH 4.5 gave the best recoveries, although no significant differences were observed.

Amine	PVP [30]		C_{18}		SAX	
	% R	RSD (%)	% R	RSD (%)	% R	RSD (%)
Ethanolamine	98	3	99	2	97	4
Histamine	93	2	100	2	96	5
Methylamine	96	4	90	5	103	6
Ethylamine	95	3	94	3	93	5
Tyramine	93	4	88	4	100	3
i-Propylamine	100	4	97	3	105	4
Propylamine	96	4	96	3	100	2
Tryptamine	94	8	92	7	98	5
Butylamine	98	4	90	6	108	4
Phenethylamine	100	2	86	6	106	5
Putrescine	97	4	100	2	91	6
3-Methylbutylamine	98	3	93	4	103	3
Amylamine	93	4	91	3	111	3
Cadaverine	95	2	100	3	101	3
Hexylamine	98	2	78	3	112	3

Table 3. Recoveries from triplicate bleaching of wine samples.

Several ion-pair reagents were also tested to increase the retention of biogenic amines in C_{18} cartridges. OSA, DeSA and DoSA at different concentrations were added to the sample after clean-up and before the concentration step at pH 4.5. For this study 15 ml of red wine spiked with 0.4 mg l^{-1} of biogenic amines were adjusted to pH 8 and passed through the SAX cartridge. Then at that time the sample was acidified (pH 4.5) and $100 \text{ }\mu\text{l}$ of ion-pair reagent was added before it was passed through the C_{18} cartridge and eluted with 3 ml of methanol. Table 4 gives the results obtained when a concentration of 100 mM of each ion-pair reagent was added. As can be seen, the best results were obtained when DeSA was used. Similar results were obtained in three cases for less polar compounds, but an increase in recoveries was observed for more polar analytes when DeSA was used. However, poor results were obtained in three cases for ethanolamine and histamine, whose recoveries were close to 30% and 50% respectively, when DeSA was used.

Amine	OSA		DeSA		DoSA	
	% R	RSD (%)	% R	RSD (%)	% R	RSD (%)
Ethanolamine	22	8	29	6	26	5
Histamine	33	6	49	4	31	7
Methylamine	31	6	73	5	30	7
Ethylamine	29	8	67	4	21	9
Tyramine	55	5	80	4	31	6
i-Propylamine	27	6	80	4	16	10
Propylamine	21	7	80	4	14	9
Tryptamine	67	5	63	5	53	6
Butylamine	60	5	76	5	48	6
Phenethylamine	79	4	73	6	70	5
Putrescine	56	5	83	5	63	5
3-Methylbutylamine	78	4	75	4	71	5
Amylamine	79	6	74	3	71	5
Cadaverine	66	6	65	6	51	4
Hexylamine	61	5	50	7	46	5

Table 4. Comparison of OSA, DeSA and DoSA as ion pair reagents (IPR). [IPR] = 100 mM, pH 4.5. Other conditions given in text.

Amine	Recovery (%)	
	100 mM	200 mM
Ethanolamine	29	31
Histamine	49	78
Methylamine	73	86
Ethylamine	67	75
Tyramine	80	93
i-Propylamine	80	81
Propylamine	80	85
Tryptamine	63	70
Butylamine	76	82
Phenethylamine	73	77
Putrescine	83	90
3-Methylbutylamine	75	79
Amylamine	74	80
Cadaverine	65	76
Hexylamine	50	54

Table 5. Comparison of concentrations of DeSA which have shown significant differences among them. pH 4.5. The RSD (%) between 3 and 7% in all the experiences done

The effect of the concentration of the ion-pair reagent was also studied. DeSA at concentrations of 50, 100 and 200 mM of DeSA was added to 15 ml of the spiked sample at pH 4.5 prior to the concentration step. The results for 50 and 100 mM were very similar, but a clear increase in recovery for more polar compounds (mainly histamine and methylamine) was observed when 200 mM DeSA was used. Ethanolamine did not show an improved recovery in any of these experiments, whereas ethylamine, tyramine, propylamine and cadaverine showed better recoveries when increasing concentration ion-pair reagent (see Table 5). For this reason, 200 mM of DeSA was chosen as the best concentration of ion-pair reagent in the SPE. A further increase of the ion-pair reagent concentration was not used because it leads to precipitation problems.

Under the optimized conditions, the volume of eluent tested again. As no significant differences were obtained between OSA and DeSA when 1, 2, 3 or 4 ml of methanol were used to desorb amines from C₁₈ cartridges, we did not consider an increase in the volumen of eluent to obtain the best accuracy. Finally, under the optimum conditions (200 mM DeSA, pH 4.5), the volume of sample was increased, but there were considerable recovery losses, mainly for more polar compounds.

The method developed allows biogenic amines to be determined at low levels with detection limits between 20 and 90 µg l⁻¹ and quantification limits between 40 and 200 µg l⁻¹. As can be seen, it improves the detection limits of the amines in wine samples. For this reason, the highest volume of samples must be treated to concentrate them to the maximum extent. Obviously, if the volume of sample had been decreased, the recoveries would have been better, but the detection limit would not have been improved with respect to other methods.

Fig 2 shows the chromatograms resulting from the analysis of a red wine spiked with 0.1 mg l⁻¹ of biogenic amines. The one shows that ethanolamine, histamine, tyramine and putrescine can be detected by direct injection of the spiked wine. The second shows the result of the optimized SPE treatment applied to the same wine. As can be seen, all of the amines can be detected and quantified, except for peak 14 and 15, whose values are close to the detection limit of the method. At the same time, SPE simplifies the beginning of the chromatogram and histamine is eluted in a cleaner zone. In the middle of the chromatogram, a peak corresponding to the excess of OPA appeared, but it does not interfere with the other peaks.

Several red wines from the Tarragona region were analysed using the proposed procedure. In all of them, ethanolamine, tyramine and putrescine

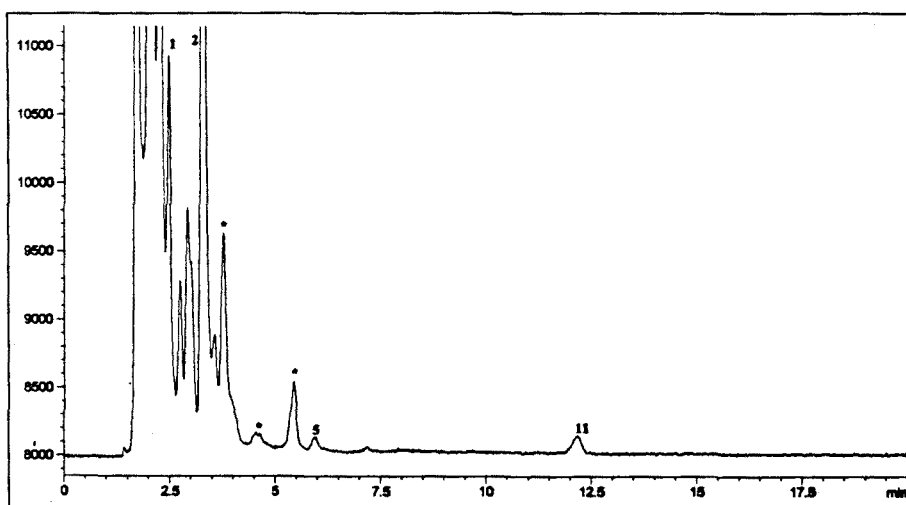


Figure 2a

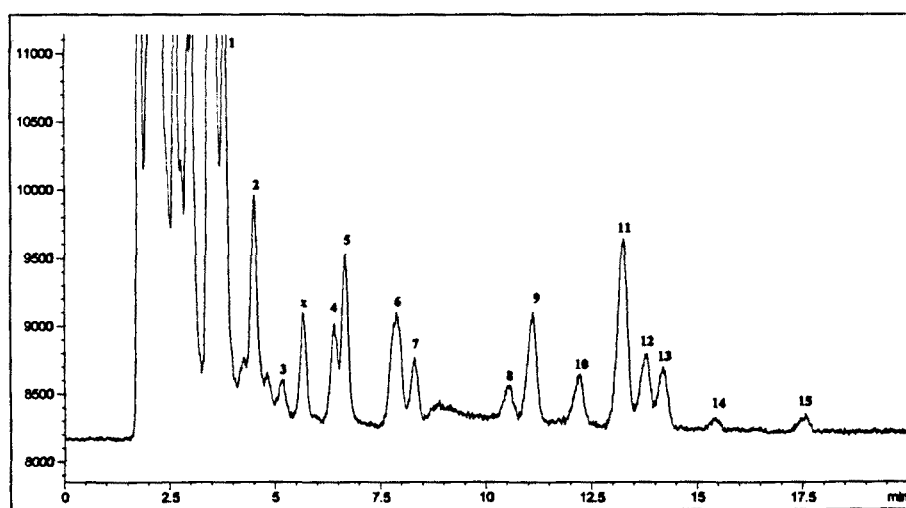


Figure 2.- Chromatograms showing the difference of SPE procedure proposed. 2a) Represents the directly injected spiked wine and 2b) Represents the same spiked wine after SPE. 1: ethanolamine, 2: histamine, 3: methylamine, 4: ethylamine, 5: tyramine, 6: i-propylamine, 7: propylamine, 8: tryptamine, 9: butylamine, 10: phenethylamine, 11: putrescine, 12: 3-methylbutylamine, 13: amylamine, 14: cadaverine and 15: hexylamine. (o): Peak corresponding to the excess of OPA. (e): Unknown.

were identified and quantified either by direct injection (without SPE) or by applying the optimized SPE method. Histamine was identified in all of the chromatograms obtained, but only those corresponding to SPE treatment was it quantified because in the others it co-eluted with other compounds. The rest of the amines were identified and quantified in almost all of the wines analysed.

Figure 3 shows an example of the chromatograms produced by the SPE of one of these samples. In this case, peaks corresponding to tryptamine, phenethylamine and cadaverine can be identified at concentrations near their detection limit. Moreover, peaks corresponding to ethylamine, tyramine and isopropylamine can be quantified, whereas by direct injection they could be only identified.

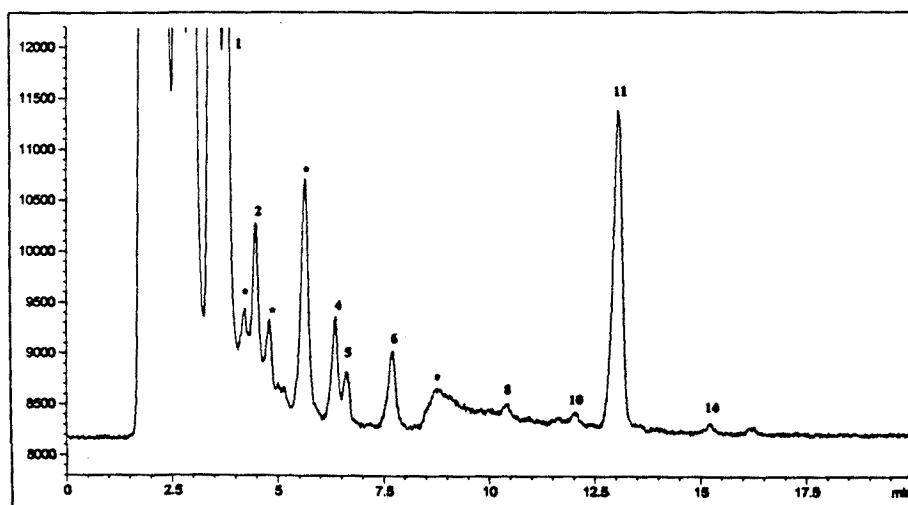


Figure 3.- Example of a red wine processed with the analytical procedure described. 1: ethanolamine, 2: histamine, 4: ethylamine, 5: tyramine, 6: i-propylamine, 8: tryptamine, 10: phenethylamine, 11: putrescine and 14: cadaverine. (o): Peak corresponding to the excess of OPA. (*): Unknown.

CONCLUSIONS

The method described in this paper has an easy, fast clean-up and concentration step prior to analysis with precolumn automatic OPA derivatization and fluorescence detection. SAX cartridges improve the clean-up of the sample and retain more polyphenolic compounds than the other analytical procedures tested. The use of an ion-pair reagent to increase recoveries in the concentration step was optimized by using C₁₈ cartridges, which allowed these compounds to be detected at $\mu\text{g l}^{-1}$ levels with no interferences.

The method was used to determine fifteen biogenic amines in red wines with satisfactory results.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CICYT (project ALI 90-0890) for financial support.

REFERENCES

- [1]. C.E. Daudt and C.S. Ough, *Am. J. Enol. Vitic.*, **31** (1980) 356
- [2]. J.A. Zee, R.E. Simard, L. L'Hereux and J. Tremblay, *Am J Enol Vitic*, **34** (1983) 6
- [3]. C.S. Ough, C.E. Daudt and E. Crowell, *J. Agric. Food Chem.*, **29** (1981) 938
- [4]. A. Ibe, K. Saito, M. Nakazato *et al.*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74** (1991) 695
- [5]. N. Sayem-el-Daher, R. Simard & L. L'Hereux, *J. Chromatogr.*, **256** (1983) 313
- [6]. C. Buteau, C.L. Duitschaever and G. Ashtonf, *J. Chromatogr.*, **284** (1984) 201
- [7]. K. Mayer and G. Pause, *Lebensm.-Wiss. Technol.*, **17** (1984) 177
- [8]. D. Frölich and R. Battaglia, *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg.*, **71** (1980) 38
- [9]. F. Addeo and A. Malorni, *Sci. Technol. Alimenti*, **IV** (1974) 241
- [10]. P. Lehtonen, *Z. Lebensm. Unters Forsch*, **183** (1986) 177
- [11]. P. Lehtonen, M. Saarinen, M. Vesanto and M.L. Riekkola, *Z. Lebensm. Unters Forsch*, **194** (1992) 434
- [12]. H. Woidich, W. Pfannhauser, G. Blaicher and U. Pechanek, *Mitt. Klosterneuburg*, **30** (1980) 27

- [13]. MC. Vidal, A. Ambattle, MC. Ulla & A. Mariné, *Am. J. Enol. Vitic.*, **41** (1990) 160
- [14]. M.C. Vidal, R. Codony and A. Mariné, *Am. J. Enol. Vitic.*, **42** (1991) 145
- [15]. R. Zappavigna and G. Cerutti, *Lebensm.-Wiss. Technol.*, **6** (1973) 151
- [16]. C. Droz and H. Tanner, *Schweiz. Z. Obst- und Weinbau*, **119** (1983) 75
- [17]. C. Tricard, J.M. Cabazeil and M.H. Salagoity, *Analisis M.*, **19** (1991) 53
- [18]. R.E. Subden and R.G. Brown, *J. Chromatogr.*, **166** (1978) 310
- [19]. H.M.L.J. Joosten and C.J. Olieman, *J. Chromatogr.*, **356** (1986) 311
- [20]. M.C. Gennaro and C. Abrigo, *Chromatographia*, **31** (1991) 381
- [21]. M. Calull, R.M. Marcé, J. Fàbregas & F. Borrull, *Chromatographia*, **31** (1991) 133
- [22]. I. Almy, C. Ough and E. Crowell, *J. Agric. Food Chem.*, **31** (1983) 911
- [23]. S. Moret and R. Bortolomeazzi, *J. Chromatogr.*, **591** (1992) 175
- [24]. H. Walther, U.P. Schlunegger, F. Friedli, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **14** (1987) 229
- [25]. A.M. Wheatley and K.F. Tipton, *J. Food Biochem.*, **11** (1987) 133
- [26]. D.L. Ingles, J.F. Back, D. Gallimore, R. Tindale and K.J. Shaw, *J. Sci. Food Agric.*, **36** (1985) 402
- [27]. J.P. Chaytor, B. Crathorne and M.J. Saxby, *J. Sci. Food Agric.*, **26** (1975) 593
- [28]. K. Saito, M. Horie, N. Nose, K. Nakagomi and H. Nakazawa, *Analytical Sci.*, **8** (1992) 675
- [29]. S. Lafon-Lafourcade, A. Joyeux, *Connaiss. Vigne Vin*, **9** (1975) 103
- [30]. O. Busto, Y. Valero, J. Guasch and F. Borrull, *Chromatographia*, **38** (1994) 571
- [31]. E. Pocurull, R.M. Marcé and F. Borrull, *Chromatographia*, in press
- [32]. O. Busto, M. Mestres, J. Guasch and F. Borrull, *Chromatographia*, **40** (1995) 404
- [33]. M.L. Izquierdo, M.C. Vidal and A. Mariné, *J. AOAC Internat.*, **76** (1993) 1027

CAPÍTULO VI

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

A lo largo de los capítulos anteriores se ha mencionado en numerosas ocasiones que una de las limitaciones más importantes que presenta el OPA como reactivo derivatizante es que solamente reacciona con grupos amino primarios, quedando por tanto excluidas de la determinación aminas como la morfolina, la pirrolidina o la dietilamina, entre otras. Por este motivo son justificables los procedimientos que emplean DnsCl u otros derivatizantes clásicos de grupos amino (FMOC, PITC, etc.) a pesar de los inconvenientes que presentan y que también han sido repetidamente citados.

Estos mismos inconvenientes han promovido la investigación de otros reactivos que combinen las ventajas de los derivatizantes citados evitando sus inconvenientes. En este sentido se han buscado fundamentalmente productos que permitan la formación reproducible de derivados estables, sin que se obtengan excesos de reactivo que interfieran en la posterior separación ni múltiples productos de cada analito.

La posibilidad de encontrar un reactivo que reúna las ventajas de los derivatizantes empleados hasta el momento en la determinación de aminas biógenas (único producto de reacción, cinética de reacción rápida, elevada sensibilidad, facilidad de automatización, etc.) ha sido un objetivo perseguido constantemente durante la realización de esta tesis.

Millipore Corp., basándose en las investigaciones de su departamento de I+D sobre el trabajo de Nimura y col. [1], comercializa desde 1993 un reactivo adecuado para el análisis de aminoácidos [2]. Este reactivo, llamado de forma abreviada AQC y comercializado como AccQ-Tag, proporciona derivados fluorescentes y estables con una mínima interferencia del derivatizante. Solamente ha sido aplicado al análisis de proteínas y péptidos en diferentes muestras entre las que no se incluye el vino.

Fue en el Congreso Internacional del Grupo de Cromatografía y Técnicas Afines, celebrado en Peñíscola a finales de 1994, cuando se dio a conocer la aplicación de este novedoso reactivo al análisis de aminoazúcares en muestras hidrolizadas. Los resultados obtenidos por Comellas y col. [3], satisfactorios en términos de reproducibilidad, linealidad y estabilidad de los derivados, nos incitó a aplicar esta tecnología al análisis de aminas biógenas en vinos, lo cual supone como ya se ha indicado una aportación original y especialmente atractiva, puesto que no existía ningún precedente de uso del AQC en análisis de este tipo quizás debido a su corta historia.

En este capítulo se ha optimizado el método de determinación de aminas biógenas por *HPLC* en fase inversa mediante derivatización precolumna con carbamato de 6-aminoquinolil-n-hidroxisuccinimidilo (AQC) y detección fluorescente de los derivados. La innovación en el uso de este reactivo confiere a este estudio especial importancia dado que *a priori* el derivatizante reúne las ventajas del DnsCl y las del OPA, ambos utilizados en capítulos precedentes.

El planteamiento de este trabajo difiere ligeramente del de los anteriores. Para iniciar el estudio se escogieron 23 de las aminas analizadas en anteriores capítulos. Ante el desconocimiento que se tenía del reactivo, fue obligado compaginar la optimización del proceso de separación cromatográfica con el de derivatización de las aminas. El punto de partida se fijó en el mencionado estudio de Comellas y col., ensayándose diferentes sistemas cromatográficos con el fin de evaluar, seguidamente, la calidad de la derivatización.

Por último, el sistema desarrollado sirvió para analizar un total de 70 muestras de vino de diferentes D.O. catalanas. Los datos recogidos se procesaron mediante un análisis exploratorio con el fin de dilucidar si las

aminas pueden ser consideradas variables adecuadas de discriminación del origen o la variedad del vino. Los resultados de este estudio final todavía no han sido publicados.

A) OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN

Las aplicaciones descritas por Waters emplean una tecnología propia (*Waters AccQ-Tag Amino Acid Analysis System*) en la que la compañía incluye la columna analítica de octadecilsilano manufacturada a tal efecto, el sistema de eluyentes y el reactivo derivatizante, compuesto por una solución amortiguadora de borato, el ACN reconstituyente del derivatizante y el AQC. Este último, una vez reconstituido, se halla en una concentración aproximadamente 10 mM. Según sus propias indicaciones (comunicación personal), cada vial de reactivo permite realizar aproximadamente 200 análisis.

La reproducibilidad del sistema propuesto por la casa comercial no supera el 0.5% en términos de tiempos de retención ni el 1% en variación de área de picos cromatográficos para un nivel de concentración de aminoácidos mantenido entre 2.5-200 μM [4].

Todos estos datos ofrecen buenas perspectivas para el desarrollo de un nuevo método de derivatización de aminos. Los derivados se separan fácilmente por cromatografía en fase inversa. La fase estacionaria empleada en el estudio descrito en el presente capítulo ha sido la misma empleada en los anteriores. Esto implica una ligera diferencia (¿importante?) con respecto a la utilizada por los investigadores precedentes que efectúan la separación cromatográfica sobre una columna AccQ-Tag cuyos grupos activos son también de C_{18} .

El uso de precolumna se hace imprescindible dada la escasa durabilidad de las columnas, además de la consabida complejidad de la muestra. Este hecho no ha sido contemplado por investigadores precedentes, quizás por las propiedades intrínsecas de la columna propuesta por la casa comercial, utilizada en todos los casos.

La fase móvil considerada inicialmente en este estudio difiere de la empleada por Comellas y col. (puesto que evitamos la adición de TEA) y coincide con la empleada en el anterior trabajo, aunque variando su fuerza inicial y la pendiente del gradiente optimizado.

Las sales amortiguadoras del pH utilizadas más habitualmente ejercen poca influencia sobre el rendimiento de la reacción de derivatización y la reproducibilidad de los resultados [4], hecho que hay que tener en cuenta dada la composición de la fase móvil que se utiliza.

No fue posible mantener la totalidad de aminas biógenas planteadas en un principio fundamentalmente por la imposibilidad de cromatografiar en un corto intervalo de tiempo todas ellas, respetando la zona inicial de elución para los aminoácidos y la zona central para el pico del exceso.

Siguiendo el criterio de menor abundancia de citas de aparición en vinos (propios o ajenos), se acordó eliminar la butilamina, la 2-metilbutilamina y la serotonina dado que coelúan con la putrescina, la fenetilamina y la amilamina, respectivamente, mientras que la morfolina y la dimetilamina se suprimieron por mostrar tiempos de retención prácticamente coincidentes con la histamina. La dietilamina se excluyó porque el sistema mostraba una sensibilidad insuficiente para su detección al nivel de concentración en el que se encontraba el resto de analitos. Finalmente, la triptamina se eliminó

porque resultaban múltiples productos de su derivatización, lo cual complicaba extraordinariamente el cromatograma.

La detección de las aminas se realiza por fluorescencia, programando las mismas longitudes de onda empleadas por otros investigadores ($\lambda_{exc}= 250$ nm y $\lambda_{em}= 395$ nm) para la detección de los AQC-derivados de aminoácidos.

B) DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNAON LINE CON AQC

La reacción del AQC con las aminas se produce en pocos segundos. El exceso de reactivo, de acuerdo con las especificaciones iniciales del producto, es consumido durante la reacción, dando lugar a la aminoquinolina (AMQ), la cual tiene propiedades espectrales diferentes de las que exhiben los otros derivados de la reacción, lo cual permite maximizar la emisión de los derivados respecto a ella. El protocolo de reacción es simple, pudiendo inyectarse la muestra directamente.

El AQC reacciona en medio alcalino con grupos amino primarios y secundarios dando lugar a derivados estables durante semanas, incluso a temperatura ambiente (figura VI.1). Aunque no es imprescindible, es

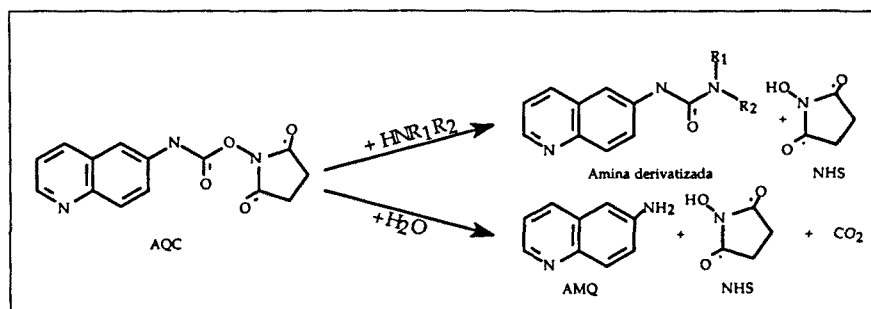


Figura VI. 1 Reacción del AQC con las aminas

conveniente controlar la temperatura de reacción aumentándola al máximo para disminuir en lo posible el tiempo de derivatización y, por tanto, el tiempo de análisis.

La linealidad de la respuesta en la detección permite cuantificar concentraciones que difieren en dos órdenes de magnitud, llegándose a límites de detección de pocos fmol. Nuestra experiencia sobre las aminas nos dice que es posible detectar los derivados por inyección directa de pocas ppb de los patrones, a diferencia de lo que ocurría con el OPA, cuyos límites de detección eran mayores en un orden de magnitud en algunos casos.

Puesto que los AQC-derivados son estables, el tiempo de reacción no es tan determinante como en el caso de los OPA-derivados. Esto significa que no es imprescindible realizar una derivatización *on line*, lo cual se traduce en una hipotética simplificación de la instrumentación, ya que puede prescindirse del inyector automático. No obstante, en este trabajo se ha optado por continuar con el inyector automático por la economía de tiempo y la comodidad que supone su uso, sobre todo cuando se inyecta un gran número de muestras.

En los estudios realizados hasta este momento con AQC se trabaja, como se ha indicado, con *loops* de inyección manual y volúmenes de muestra y de derivatizante elevados para nuestras pretensiones. El sistema de inyección automática que utilizamos tiene que optimizarse respecto a la secuencia de inyección de borato/derivatizante/muestra en la cámara de mezcla, los volúmenes tomados de cada uno de ellos, los tiempos de derivatización, etc. En el artículo que se publicará en la revista *Journal of Chromatography* (y que se incluye en el anexo a este capítulo) se detalla el procedimiento seguido para esta optimización.

Algunos de los inconvenientes más destacables que presenta esta técnica es la imposibilidad de eliminar el exceso de reactivo tras la derivatización. Esta afirmación difiere diametralmente con la reseñada en los trabajos con AQC que se habían realizado con aminoácidos, en las que se señala que el reactivo no interfiere debido a que se hidroliza convirtiéndose en aminoquinolina (AMQ, $\lambda_{em, max} = 520$ nm) y N-hidroxisuccinimida (NHS) no fluorescente.

Nuestra experiencia nos indica que en la zona media del cromatograma sí se detecta la presencia del exceso de reactivo. Este pico detectado parece no ser la AMQ, dado que, de acuerdo con sus datos espectrales, debería presentar el máximo de emisión a 520 nm, cosa que no ocurre. Por tanto, el pico correspondería a un exceso de reactivo derivatizante no hidrolizado, probablemente atribuido a las diferencias en el diseño experimental existentes entre nuestro trabajo y los otros precedentes (analitos, fase móvil y columna cromatográfica, fundamentalmente).

Diferentes pruebas encaminadas a reducir este exceso han consistido en diluir el reactivo (disminuye también la respuesta de las aminas), disminuir su volumen (instrumentalmente imposible reducirlo a menos de 0.5 μ l) y añadir prolina (puesto que es uno de los aminoácidos mayoritarios en el vino, podría resultar adecuado adicionarlo a la solución patrón). Ninguna de estas experiencias ofreció resultados satisfactorios, por lo que se optó con trabajar con la adición de la menor cantidad posible del derivatizante concentrado asegurándose de que la respuesta cromatográfica de los derivados no se viera afectada. Para que no se vea afectada esta respuesta es necesario un exceso de reactivo superior a 2.5 veces la molaridad de las solución en sustancias aminadas [2].

El método finalmente establecido permite determinar por inyección directa los contenidos de aminas biógenas en vinos.

C) APLICACIÓN DEL MÉTODO A MUESTRAS DE VINOS DE DIFERENTES D.O.

Se ha analizado el contenido de aminas biógenas en vinos de diferentes D.O. y variedades. Tal y como se esperaba, se observa mayor concentración de aminas biógenas en los vinos tintos que en los rosados y en los blancos. En las figuras VI.2-5 se indican de forma gráfica los resultados de estos análisis, representándose el número de muestras analizadas frente a los contenidos en $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de cada una de las aminas encontradas.

Como puede apreciarse, en los vinos tintos solamente la histamina muestra contenidos superiores a $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en la mayor parte de las muestras (sin sobrepasar nunca los $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), mientras que metilamina, etanolamina y etilamina presentan contenidos que no superan en ningún caso los $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Respecto a los vinos blancos, la mayor parte de las muestras registran contenidos de histamina y putrescina entre 1 y $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, no apareciendo cantidades significativamente altas de otras aminas.

Los vinos rosados muestran niveles de concentración moderadamente elevados (entre 1 y $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) para etanolamina, histamina y putrescina, apareciendo en algunas muestras contenidos anormalmente altos de histamina (sin superar en ningún caso los $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), lo cual puede situarlos en un punto intermedio entre los vinos tintos y los vinos blancos

Recordemos que una de las fuentes de procedencia de las aminas biógenas son las bacterias lácticas que se encuentran en la piel de la uva, con lo que el proceso de maceración estará íntimamente relacionado con el contenido total de aminas biógenas en el vino. Así, a los vinos tintos les corresponderá mayor concentración que a los rosados y los blancos.

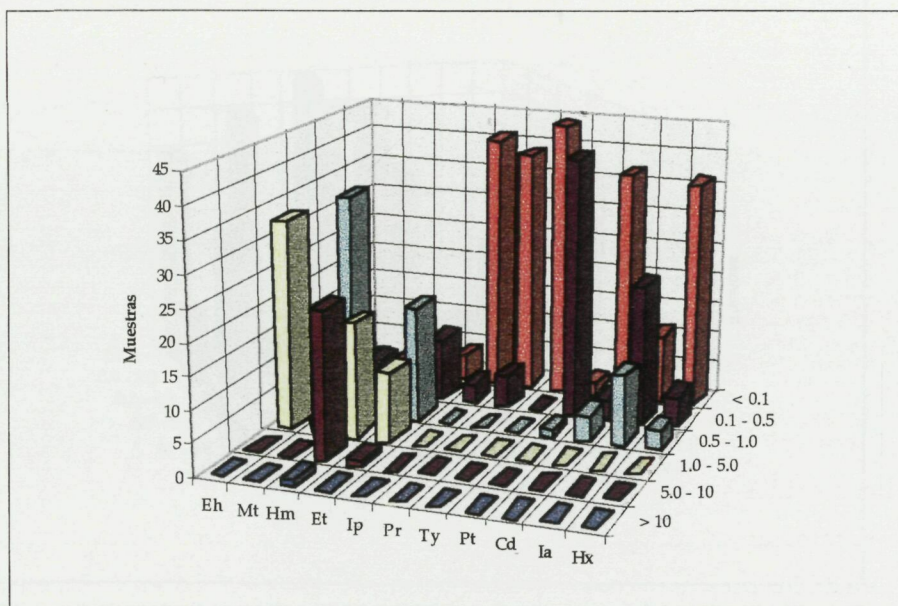


Figura VI.2. Distribución de los contenidos de aminas biógenas en los vinos tintos derivatizados con AQC. Eh: etanolamina, Mt: metilamina, Hm: histamina, Et: Etilamina; Ip: isopropilamina, Pr: propilamina; Ty: tiramina, Cd: cadaverina, Ia: isoamilamina, Hx: hexilamina. Concentraciones en $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

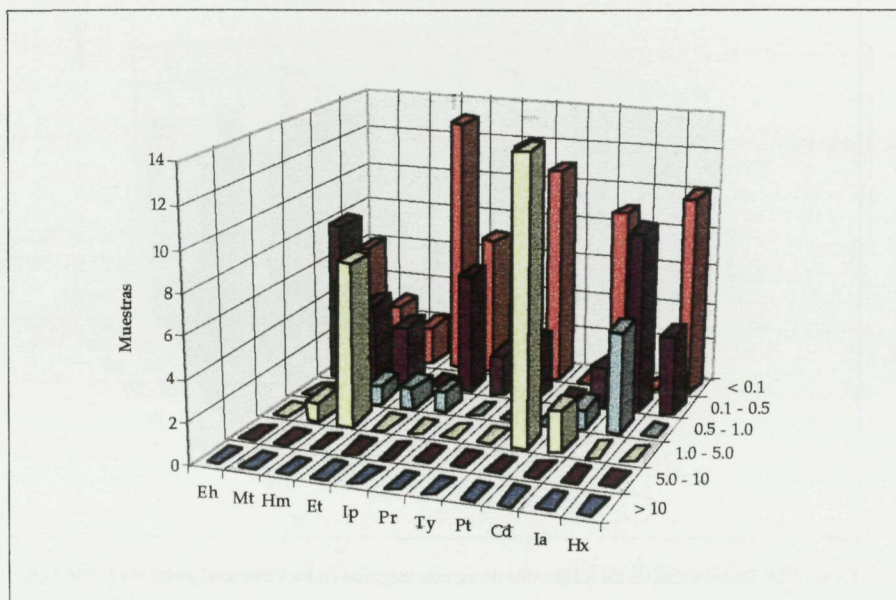


Figura VI.3. Distribución de los contenidos de aminas biógenas en los vinos blancos derivatizados con AQC

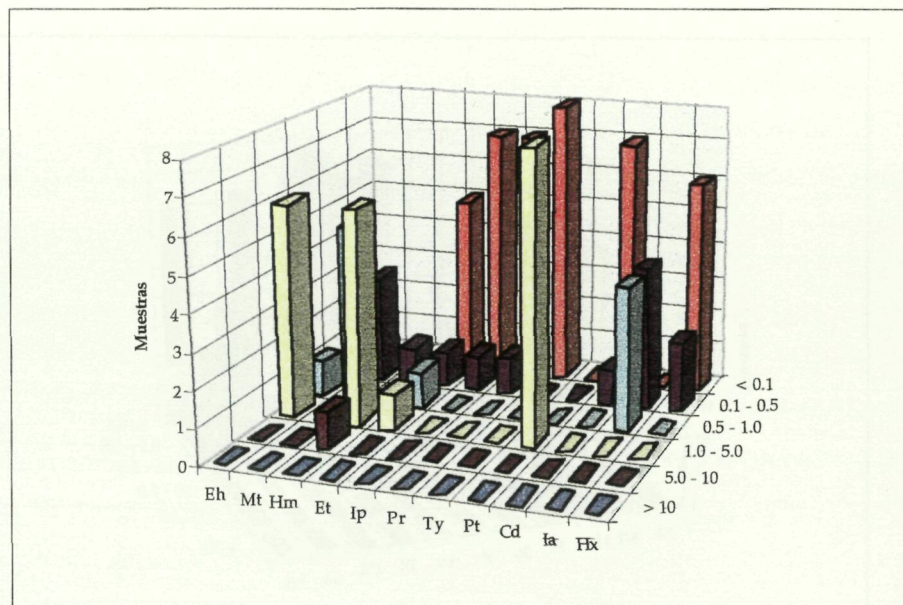


Figura VI.4. Distribución de los contenidos de aminas biógenas en los vinos rosados derivatizados con AQC

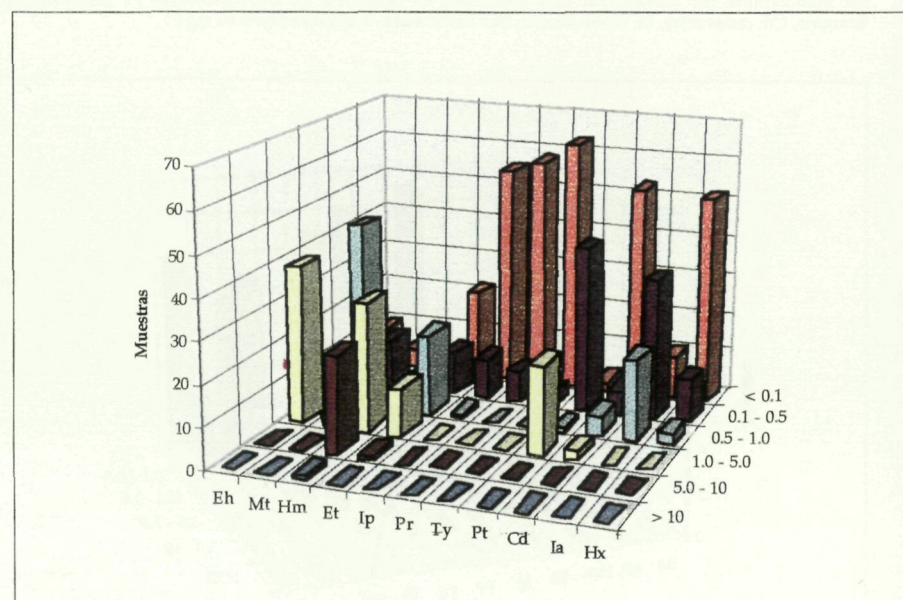


Figura VI.5. Distribución de los contenidos de aminas biógenas en los vinos analizados mediante AQC

No se visualizan *a priori* correlaciones entre variedades y D.O. y niveles de concentración de aminos, aunque sí se ha intentado establecer esta correlación mediante el estudio descrito en el apartado siguiente y que se ha realizado en colaboración con la Dra. Larrechi a la que deseo manifestar mi agradecimiento.

D) ANÁLISIS EXPLORATORIO DEL CONTENIDO DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS

Se ha realizado el estudio específico del perfil del contenido en aminos de los 70 vinos monovarietales recogidos en las gráficas VI.2 a VI.5. Las aminos estudiadas han sido las 11 seleccionadas en la parte inicial de este trabajo: etanolamina, metilamina, histamina, etilamina, isopropilamina, propilamina, tiramina, putrescina, cadaverina, isoamilamina y hexilamina. Sus contenidos se han observado desde el punto de vista de la variedad, la D.O. y el color del vino. Dado que en el planteamiento inicial no se contemplaba la posibilidad de que estos resultados pudieran emplearse para efectuar un estudio estadístico exhaustivo, la toma de muestra no sigue la pauta que hubiese sido adecuada para este fin, aunque el elevado número de muestras analizado sirve para obtener un resultado cuando menos aproximado al real.

El método utilizado fue la representación de las variables (contenido en aminos) mediante gráficos *Box-and-whisker* [5]. Se trata de un método no paramétrico que utiliza la mediana y el intervalo intercuartil como estimación del valor central y de la dispersión de los datos, respectivamente. Este tipo de representaciones son muy robustas, ya que la mediana es menos sensible a la dispersión de los datos que la media empleada en los tests paramétricos. Del mismo modo, el intervalo intercuartil es menos sensible a valores extremos que la desviación estándar utilizada en los tests paramétricos.

El resultado es un gráfico de caja (*boxplot*) en el que se representan todos los datos y que nos permite visualizar, además de la mediana y los intervalos ya mencionados, la simetría de la distribución, su amplitud y la posible presencia de puntos discrepantes.

En las figuras VI.6 a VI.8 se muestran los *boxplot* correspondientes a las aminas en estudio para cada uno de los factores considerados (color, D.O. y variedad). La gráfica del color (figura VI.6) corrobora el resultado obtenido en el apartado anterior. Como puede apreciarse, es mayor el contenido de aminas biógenas en vinos tintos que en rosados y blancos. Bajo este punto de vista, un nivel de concentración de aminas biógenas anormalmente alto en vinos blancos o rosados podría considerarse indicativo de manipulaciones defectuosas o fraudulentas.

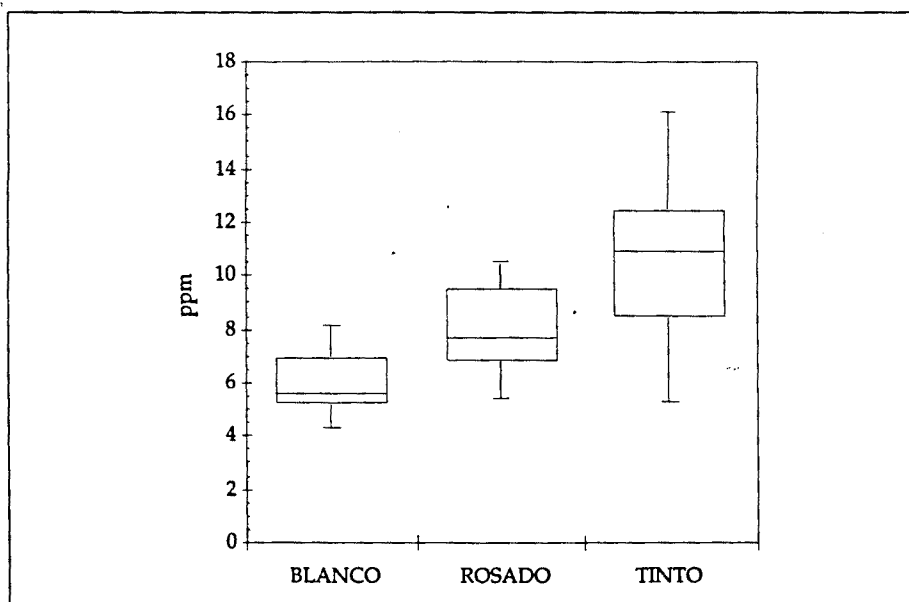


Figura VI.6. *Box-and-whisker* para la concentración total de aminas en función del color del vino

Para el análisis exploratorio de las denominaciones de origen se ha contado con muestras de las siguientes procedencias: Tarragona, Terra Alta, Priorat, Conca de Barberà, Penedès, Empordà y Costers del Segre. Solamente se han representado las aminas de las que se disponían muestras originarias de tres o más D.O. y en concentraciones superiores al límite de determinación.

La histamina se encuentra en todas las D.O. analizadas, siendo su nivel de concentración medio ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) en el Priorat de $2.99 (\pm 1.11, n=6)$, en la Terra Alta de $1.23 (\pm 0.77, n=6)$, en Tarragona de $3.33 (\pm 3.38, n=20)$, en la Conca de Barberà de $2.88 (\pm 2.45, n=6)$, en Costers del Segre de $1.27 (\pm 1.90, n=3)$, en Empordà de 9.77 y en el Penedès de $5.06 (\pm 1.62, n=29)$. Las desviaciones estándar relativas (valores entre paréntesis) aportan la idea de la dispersión de datos existente, corroborando la hipótesis inicial de que la representación no paramétrica de *Box-and-whisker* se aproxima más a la realidad.

La putrescina, la metilamina y la isoamilamina también se encuentran en todas las D.O. analizadas. Los niveles de concentración medio ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) oscilan entre los $3.95 (\pm 0.93)$ del Penedès y los $2.96 (\pm 0.62)$ de la Terra Alta para la putrescina, mientras que los de la metilamina fluctúan entre los $0.83 (\pm 0.28)$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de la Conca de Barberà y los $0.27 (\pm 0.25)$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de la Terra Alta. Para la isoamilamina la concentración media máxima es de 0.79 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Empordà) y la mínima de $0.20 (\pm 0.07)$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en el Penedès.

No se han hallado concentraciones superiores al límite de determinación de la etilamina en las D.O. Costers del Segre ni Empordà. Los niveles medios en las D.O. restantes oscilan entre los $1.03 (\pm 1.09)$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ del Penedès y los $0.20 (\pm 0.26)$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Tarragona.

Excepto Costers del Segre y Penedès, todas las D.O. registran niveles de cadaverina entre 0.7 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Empordà) y $0.08 (\pm 0.05)$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Priorat).

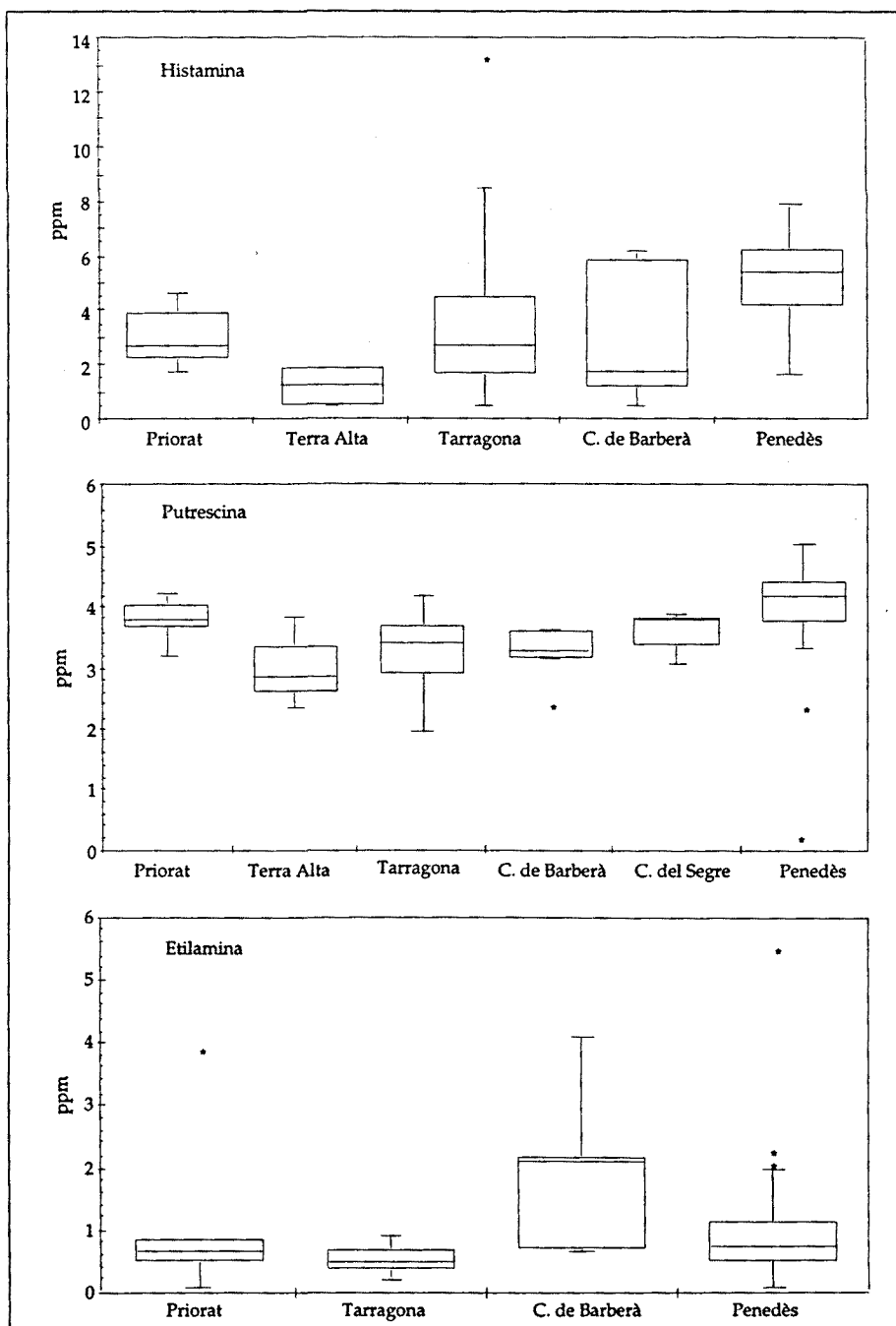


Figura VI.7. Box-and-whisker de aminas en función de la D.O. del vino

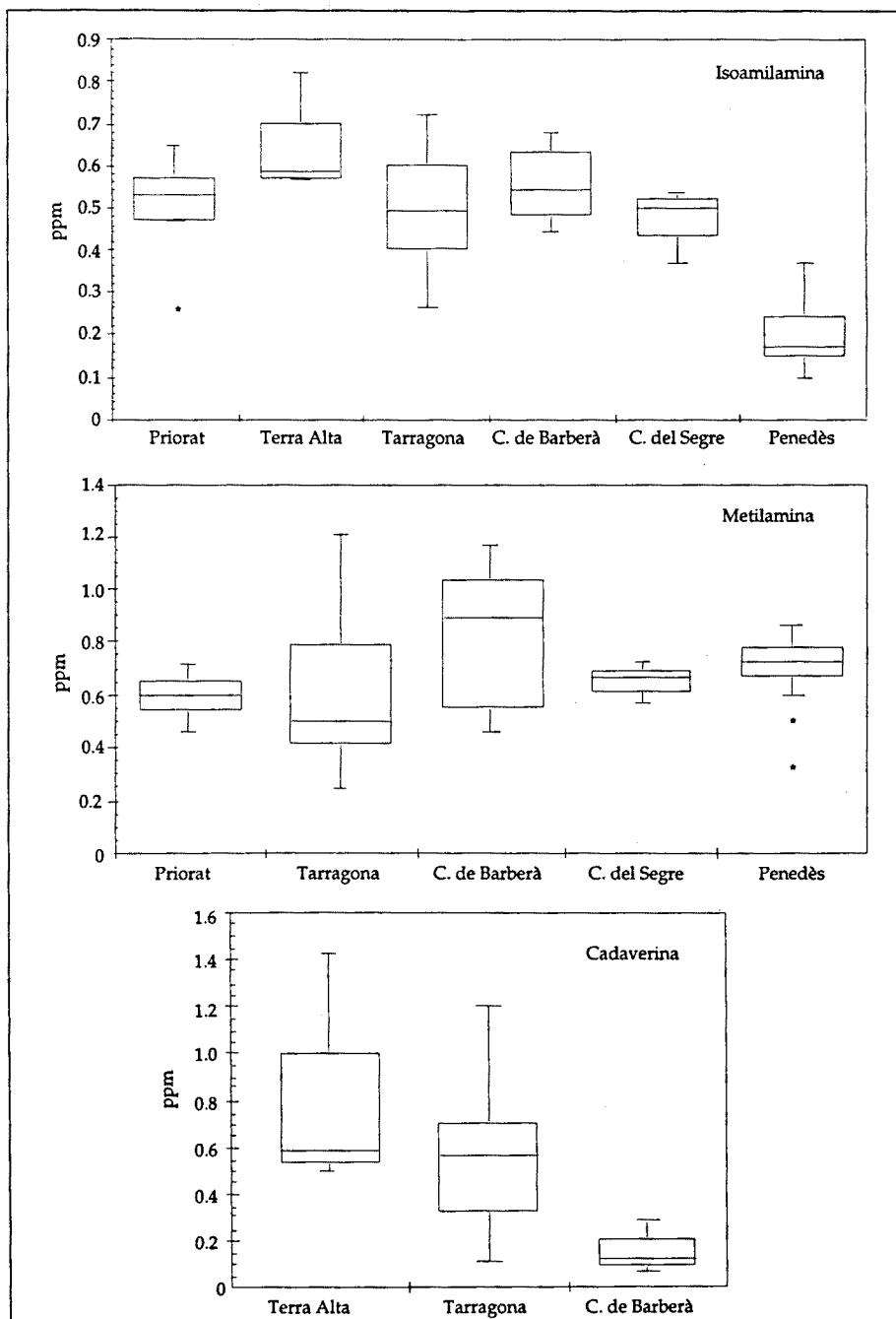


Figura VI.7 cont. Box-and-whisker de aminas en función de la D.O. del vino

Para el análisis exploratorio de las variedades se ha contado con vinos monovarietales de Cabernet, Garnacha, Cabernet Sauvignon, Cariñena, Merlot, Macabeu, Moscatel, Tempranillo, Chardonnay, Parellada y Sauvignon. Se han representado aquéllas de las que se disponía de muestras pertenecientes a un mínimo de 4 variedades diferentes. Los resultados son en numerosas ocasiones contradictorios. Así, la etilamina encontrada en las D.O. Priorat y Tarragona es catalogada como mayoritaria en las variedades Garnacha y Cariñena, mientras que es minoritaria en Cabernet Sauvignon y Merlot. Todo lo contrario ocurre en las D.O. Conca de Barberà y Penedès.

Exceptuando la variedad Moscatel en la que no se ha encontrado histamina, y que no puede considerarse representativa dado que solamente se ha analizado una muestra, en el resto de variedades ha aparecido histamina en niveles de concentración medios ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) oscilantes entre los 0.99 (± 0.66 , $n=8$) de la variedad Macabeu y los 5.92 (± 5.13 , $n=5$) de la variedad Tempranillo.

La putrescina también se encuentra en todas las variedades analizadas a niveles de concentración, en $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, que fluctúan entre los 2.38 (± 1.47) de la variedad Tempranillo y los 4.44 (± 4.22 , $n=13$) del Cabernet Sauvignon. La etilamina oscila entre los 0.12 (± 0.19) de la variedad Macabeu y los 1.98 (± 1.74 , $n=7$) de la Merlot. El contenido de metilamina en todas las variedades muestra unos valores bastante uniformes para todas las variedades, entre 0.57 (Garnacha ($n=17$), Macabeu y Tempranillo) y 0.77 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Merlot).

La isoamilamina, presente igualmente en todas las variedades, muestra asimismo un contenido uniforme con valores entre los 0.24 (± 0.26) $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ para el Cabernet Sauvignon y los 0.52 (± 0.10) $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ del Macabeu. La cadaverina, finalmente, se encuentra de forma más significativa en las variedades Tempranillo, Macabeu y Garnacha, aunque los niveles de concentración no sobrepasan en ningún caso los 0.3 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

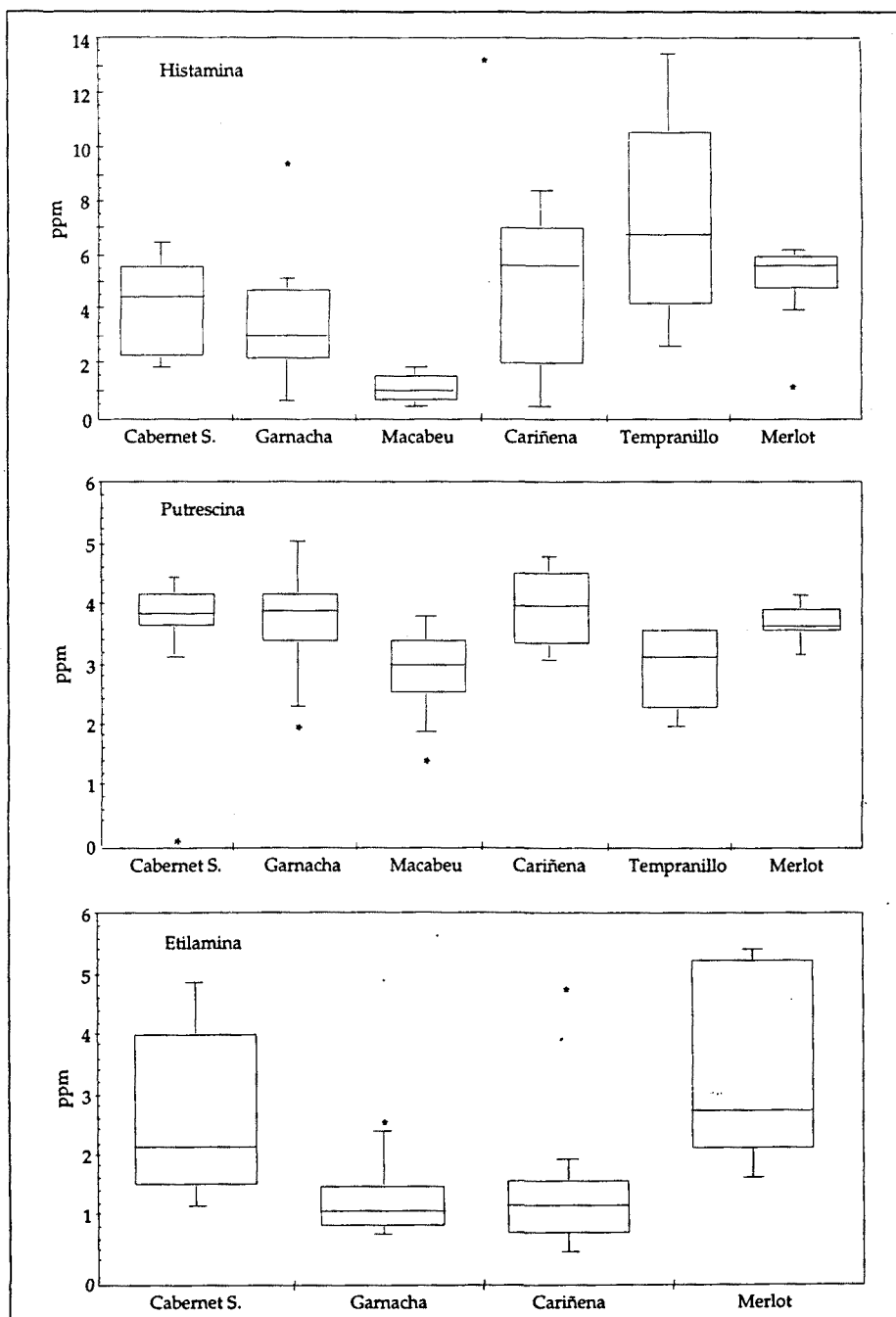


Figura VI.8. Box-and-whisker de aminas en función de la variedad del vino

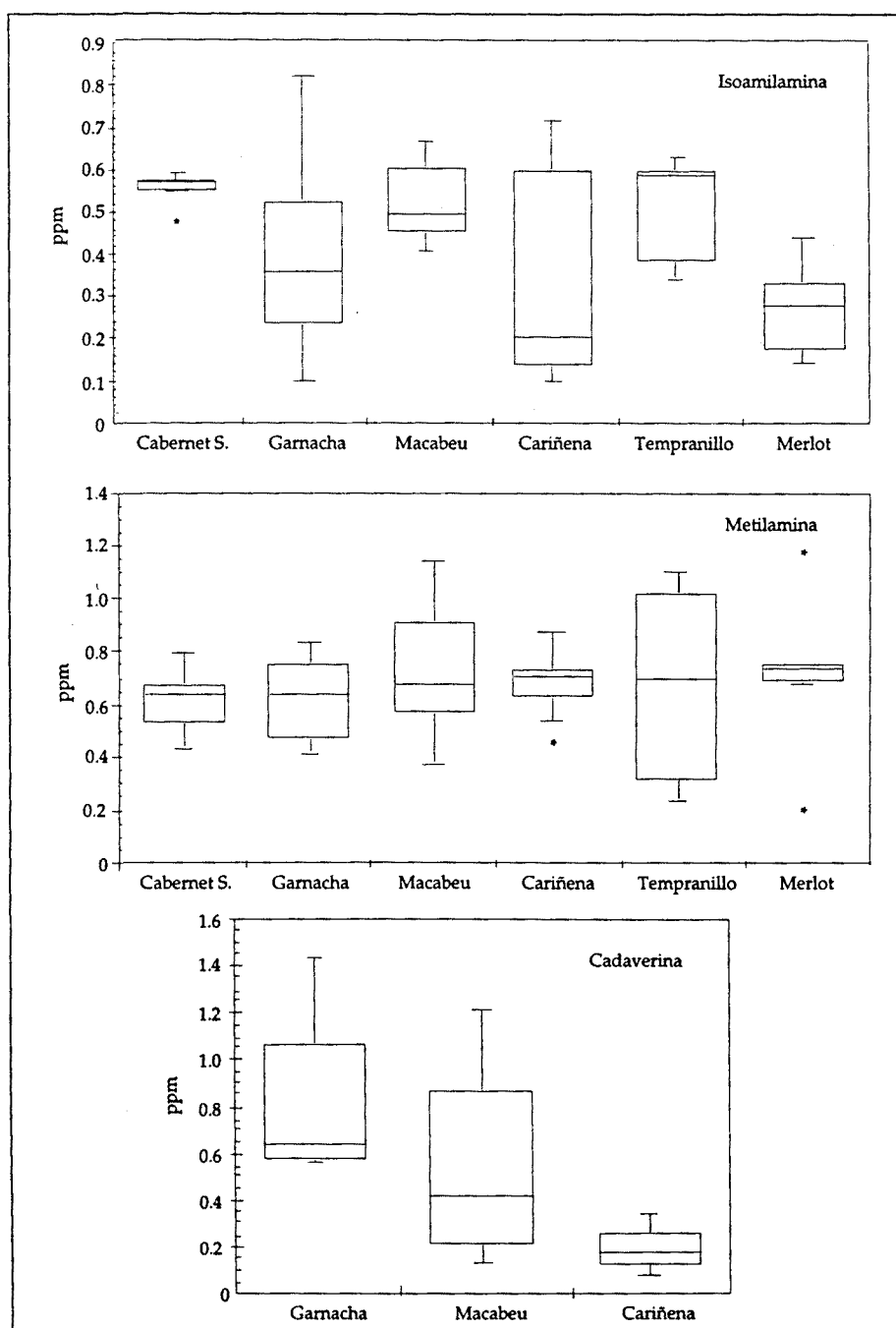


Figura VI.8 cont. *Box-and-whisker* de aminas en función de la variedad del vino

E) CONCLUSIONES

Como resumen final del capítulo, cabe citar entre las ventajas del AQC su rapidez de reacción con aminas primarias y secundarias y la estabilidad de los derivados resultantes. El derivado correspondiente a la histamina, menos polar que su homólogo obtenido por derivatización con OPA, muestra un tiempo de retención algo mayor y, por tanto, es más fácilmente cuantificable debido a la ausencia de aminoácidos en su zona de elución.

La sensibilidad de detección del método supera a la obtenida con los OPA-derivados cuando se trabaja con patrones, siendo del mismo orden de magnitud cuando se trabaja con muestras reales. Una mejora de los LOD de este método comportaría el acoplamiento *off-line* de algún proceso de concentración de aminas, procedimiento que ha sido aplicado con éxito en el trabajo descrito en el capítulo siguiente.

Como inconvenientes cabría destacar su elevado coste, la interferencia del reactivo y, sobre todo, la escasa duración de las columnas C₁₈ de base sílice (aproximadamente 100 inyecciones, mientras que con el OPA se triplicaba esta cantidad). Esta inestabilidad de la columna se traduce en cierta variabilidad de tiempos de retención que es necesario controlar, sobre todo para evitar la superposición de los picos inmediatamente posteriores al del exceso con este mismo.

Los resultados del análisis exploratorio corroboran los de estudios realizados anteriormente por otros investigadores [6-9]. No obstante no existe uniformidad de criterios al respecto, existiendo referencias [10] en las que se han constatado diferencias estadísticamente significativas ($P=0.05$) entre vinos de diferentes D.O. en lo que se refiere a contenido en histamina y tiramina. Estas diferencias se justifican bajo la idea de que puede haber

variaciones en los factores que condicionan la formación de aminas biógenas en los vinos en función de su origen.

Respecto a la variedad, también existen discrepancias en las conclusiones de diferentes estudios. Así, Ough [8] sí constata diferencias significativas en el contenido de aminas biógenas entre la variedad Pinot Noir y Cabernet Sauvignon, mientras que Cabanis y col. [11] afirman que estas diferencias no son en absoluto generalizables sino más bien atribuibles a los diferentes procesos de vinificación.

Finalmente, las conclusiones respecto al color del vino y, más concretamente, al tipo de vinificación practicado, se decantan de forma prácticamente unánime [11, 12] por la hipótesis de que sí influyen sobre el aporte de aminas biógenas a los vinos.

Seguidamente se incluye el artículo en el que se detalla todo el procedimiento de optimización de condiciones de derivatización y separación llevadas a cabo, así como los datos de concentración de aminas encontradas en las muestras analizadas. Está pendiente de publicación en el *Journal of Chromatography*.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. N. Nimura, K. Iwaki, T. Kinoshita, K. Takeda y J. Ogura. *Anal Chem* 58:2372 (1986)
- [2]. S.A. Cohen y D.P. Michaud. *Anal Biochem* 211:279 (1993)
- [3]. J. Díaz, J. Lliberia, L. Comellas y F. Broto. *J Chromatogr* 719:171 (1996)

- [4]. N.E. Astephen. *Waters Application Notebook* (1993)
- [5]. M. Meloun, J. Militky y N. Forina. *Chemometrics for Analytical Chemistry*. Vol. 1. pp. 42-55. Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry. Ellis Horwood, Chichester (1992)
- [6]. P. Spettoli. *Industrie Agrarie* 9:1 (1971)
- [7]. G. Cerutti y L. Remondi. *Riv. Vitic. Enol. Conegl.* 2:66 (1972)
- [8]. C.S. Ough. *J Agric Food Chem* 19:241 (1971)
- [9]. T. Bauza, A. Blaise, P.L. Teissedre, J.P. Mestres, F. Daumas y J. C. Cabanis. *Sci Aliments* 15:559 (1995)
- [10]. M.C. Vidal-Carou. *Aminas biógenas en vinos: histamina y tiramina. Análisis, contenidos y evolución*. Ph. D. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona (1987)
- [11]. T. Bauza, A. Blaise, J.P. Mestres, P.L. Teissedre, F. Daumas, J.C. Cabanis. *Sci Aliments* 15:367 (1995)
- [12]. M.C. Vidal, R. Codony y A. Mariné. *Food Chem* 35:217 (1990)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

J Chromatogr A, in press

DETERMINATION OF BIOGENIC AMINES IN WINE AFTER PRECOLUMN DERIVATIZATION WITH 6-AMINOQUINOLYL-N-HYDROXYSUCCINIMIDYL CARBAMATE

O. Busto^a, J. Guasch^a and F. Borrull^b

^aDepartament de Química, Escola d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Avda. Ramón y Cajal, 70
43005 Tarragona, Spain

^bDepartament de Química, Facultat de Química, Universitat Rovira i Virgili, Pça. Imperial Tàrraco, 1
43005 Tarragona, Spain

Received: Aug 11, 1995
Revised manuscript received: Jan 3, 1996
Accepted: Jan 8, 1996

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

DETERMINATION OF BIOGENIC AMINES IN WINE AFTER PRECOLUMN DERIVATIZATION WITH 6-AMINOQUINOLYL-N-HYDROXSUCCINIMIDYL CARBAMATE

Key Words: Derivatization, LC; Wine; Food Analysis; Amines; Biogenic amines; Aminoquinolyl-n-hydroxysuccinimidyl carbamate

ABSTRACT

AQC (6-aminoquinolyl-n-hydroxysuccinimidyl carbamate) was used as an alternative to the most common derivatization reagent, OPA (*o*-phthalaldehyde), to determine sixteen biogenic amines in wines. OPA and AQC were compared in terms of the range of linearity, the limit of detection and the sensitivity (calibration line slopes) resulting from the application of each of the derivatization reagents. Sample handling is minimal because derivatization is fully automated by means of an injection programme. After derivatization, the derivatives were analysed by reversed-phase liquid chromatography with gradient elution and fluorimetric detection. All the amines studied eluted in less than 25 min under the optimum conditions established. Different variables that affect derivatization and separation are optimized. Good linearity of the responses was obtained between 0.05 and 10.00 mg l⁻¹ depending on the amine derivative. The detection limits ranged between 5 and 50 µg l⁻¹ for standard solutions and between 100 and 500 µg l⁻¹ for wines. The method was successfully applied to the determination of the above amines in several types of wines from the Tarragona region.

INTRODUCTION

Biogenic amines can be a food poisoning hazard. They are commonly found in fermented foods, e.g., cheese, dry sausages and wine (mainly red wine) and some of them are usually assumed to be involved in the development of

alcohol dependence [1] and may also cause unnatural or toxic effects when consumed in large amounts [2].

There is a great diversity of biogenic amines in food and particularly in wine, where histamine, putrescine, cadaverine and tyramine have been studied much more than other amines, because they can elicit physiological responses in humans [3].

Current research is aimed at achieving good methods for determining low contents of biogenic amines in wine which are both repeatable and reproducible [4]. To this end, amines are analysed in a variety of ways, including fluorimetric [5,6] and gas-liquid chromatographic (GLC) [3, 7-10] methods. However, the most commonly used method is HPLC, although ion partition column chromatography [11] and ion pair HPLC have also been proposed [12]. The separation of underivatized amines by ion-pair chromatography is a well-known technique [13] but it has the drawback that amines such as putrescine and cadaverine cannot be detected since they lack a suitable chromophore, whereas others such as histamine must be detected at wavelengths that are not selective, so the risk of interfering matrix components cannot be neglected, especially when dealing with wines. In addition, ion-exchange HPLC and post column derivatization are time consuming and more expensive [14].

In order to prevent matrix interference and so enhance detection sensitivity when using HPLC, derivatization reactions with dansyl-chloride (DnsCl) [15-19] and o-phthaldialdehyde (OPA) [4, 5, 18, 20-24] in the presence of 2-mercaptoethanol are commonly used. Phenylisothiocyanate (PITC) [25], fluorenyl methyl chloroformate (FMOC-Cl) [14, 26], benzoyl chloride [27], and fluorescamine [18, 28] are other derivatizing agents used in these determinations. However, the use of these reagents involves a number of

drawbacks. PITC derivatives cannot be detected by fluorescence, and the methods used for them are less sensitive than those for other derivatization reagents. FMOOC gives good sensibility and stability of its derivatives, but it produces multiple products from a single amine, so it is not suitable when dealing with complex samples or multiple standards. DnsCl and benzoyl chloride are non-specific reagents, since they react not only with primary and secondary amino groups, but also with phenols, aliphatic alcohols and some sugars. Furthermore, the relatively long reaction time makes automatic precolumn derivatization impossible. As the benzoylated amines do not fluoresce, these compounds are generally detected with the less sensitive UV detector.

Using OPA instead of fluorescamine has more advantages, since it reacts with primary amines in a few minutes, and forms strong fluorescent derivatives which increase the method's selectivity with fluorimetric detection. This reaction can easily be automated because of the short reaction time [4, 21, 29, 30]. However, OPA derivatives are not very stable, they do not allow for clean up after the derivatization processes and strict derivatization conditions are also necessary. Further, the structures of these products have only been fully ascertained for reactions in the presence of a thiol such as mercaptoethanol. The reaction also seems to be strongly dependent upon structural and other factors since many amines, notably histamine, do not require mercaptoethanol to produce highly fluorescent products; in fact, mercaptoethanol will decrease the intensity of fluorescence [31]. Some investigators have worked on improving the determination of histamine using derivatizing agents such as luminarin 1 or 2, but the derivatization conditions are very strict and time consuming [32].

In this paper, a precolumn derivatization reagent is proposed in order to avoid the drawbacks of reagents such as DnsCl and OPA. 6-aminoquinolyl-

n-hydroxysuccinimidyl carbamate has already been reported as being of use in the precolumn derivatization of primary and secondary amino acids [33, 34]. Here we report a rapid method for determining sixteen primary and secondary biogenic amines in wines.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

The sixteen amines studied were ammonia, ethanolamine, methylamine, histamine, ethylamine, pyrrolidine, isopropylamine, propylamine, tyramine, isobutylamine, putrescine, cadaverine, phenethylamine, 3-methylbutylamine, amylamine and hexylamine, all of which were supplied by Aldrich-Chemie (Beerse, Belgium). An individual stock standard solution of 2000 mg l⁻¹ of each amine was prepared in HPLC-grade methanol (Scharlau, Barcelona, Spain) and stored in darkness at 4°C. Solutions for further studies were prepared by diluting these stock standard solutions with water purified using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). A solution of 2000 mg l⁻¹ of heptylamine as internal standard was prepared and diluted 1000-fold.

The methanol and tetrahydrofuran used in the chromatographic analysis and the sodium acetate used to prepare the mobile phase were of HPLC grade (Scharlau). For the automatic derivatization method an AccQ-Fluor Reagent Kit (Waters, Milford, MA, USA) was used.

Equipment

Chromatographic experiments were performed using a Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany) Model 1050 liquid chromatograph with an HP Model 1046A fluorescence detector. The samples were derivatized and injected with an HP Series 1050 automatic injector. Separation was performed using a Spherisorb ODS-2 cartridge (250 x 4.6 mm I.D., particle size 5 μm) preceded by a Spherisorb ODS-2 precolumn, both thermostated at 65°C, and supplied by Hewlett-Packard. Chromatographic data were collected and recorded on an HP ChemStation version A.01.01.

High-performance liquid chromatographic method

Two solvent reservoirs containing (A) 0.05M sodium acetate solution in 1% tetrahydrofuran and (B) methanol were used to separate all the amines with gradient elution. The programme used was as follows: initial isocratic elution at 25% methanol for 5 min, followed by linear gradient elution from 25% to 80% until 25 min. The column was cleaned up by eluting 100% of methanol for 3 min. Finally, the programme ended by returning to initial conditions and stabilizing the corresponding mobile phase in 2 min. The eluted AQC-derivatives were detected by monitoring their fluorescence using 250 nm and 395 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively. The flow-rate was fixed at 1 ml·min⁻¹. Under these conditions all sixteen amines were eluted in less than 25 min.

Derivatization

The derivative reagent was formed by reconstituting the 6-aminoquinolyl-n-hydroxy-succinimidyl carbamate with acetonitrile (final concentration approximately 10 mM according to the specifications of the Waters Fluor Reagent Kit). The alkalinity needed to perform the derivatization is obtained by using the borate buffer (pH 8.8) supplied by Waters in the same Fluor Reagent Kit (AccQ-Tag).

The derivatization was fully automated by means of an injection programme. The injection system mixes the reagents automatically after cleaning the injection needle three times with acetonitrile in order to ensure the repeatability of the results. The AQC, the borate buffer and the sample are drawn sequentially into the injection needle. In order to ensure that the sample is fully mixed with the borate buffer, there is a previous mixing step

Step	Action	Amount	Details	Substance
10	Draw	2 µl	Air	
20	Draw	20 µl	From Vial 1	ACN* for needle wash
30	Eject	20 µl	Into Vial 4	Empty
40	Draw	20 µl	From Vial 1	ACN for needle wash
50	Eject	20 µl	Into Vial 4	Empty
60	Draw	20 µl	From Vial 1	ACN for needle wash
70	Eject	20 µl	Into Vial 4	Empty
80	Draw	10 µl	From Sample	
90	Eject	10 µl	Into Seat	
100	Draw	0 µl	Vial 1	ACN for needle wash
110	Draw	6 µl	Vial 2	Borate buffer
120	Eject	6 µl	Into Seat	
130	Mix	16 µl	Needle In Seat	ten cycles
140	Draw	0 µl	From Vial 1	
150	Draw	0.5 µl	From Vial 3	AccQ-Tag (derivatizing agent)
160	Eject	0.5 µl	Into Seat	
170	Mix	16.5 µl	Needle In Seat	ten cycles
180	Wait	5 min		
190	Inject			START ANALYSIS

Table 1. Injection programme for the derivatization of biogenic amines with AQC. *Acetonitrile

before adding the AQC reagent. All the reactants are then mixed by drawing them back and forth in the injection seat. Finally, the mixture is injected into the column and separated using gradient elution. The steps in the derivatization sequence are summarized in Table 1.

RESULTS AND DISCUSSION

Biogenic amines have traditionally been analysed chromatographically by making them react with different derivatizing agents that produce fluorescence and thus improve selectivity of established methods. AQC has been successfully used to derivatize alkylamines [33] and amino acids [33-35]. The ease of sample derivatization, the stability of the derivatives and its sensitivity to all the amines studied encouraged us to use it for determining biogenic amines in wines.

The same solvents as used in previous work [30] with OPA as derivatization reagent for wines were used as the mobile phase. They were chosen because unstable organic modifiers such as triethanolamine, which is used in similar analyses to reduce band broadening, reduces the life of the column, as we have observed before.

Since AQC-derivatives are more polar than OPA derivatives, the percentage of the methanol in the mobile phase at the start had to be decreased to obtain good resolution among the first chromatographic peaks. Different compositions of the mobile phase were tested and 25% MeOH was adopted as the best initial conditions. This percentage should not be decreased as it is important not to lengthen the time of the chromatogram if possible. Further, an increase in the percentage of methanol in the initial mobile phase would

produce an overlap between the peaks corresponding to amino acids and those recorded for the first biogenic amine derivatives.

During the experiments it became clear that the life of the column was strongly dependent on the mixture of the AccQ-Tag reagent with the mobile phase, which is not observed when dealing with OPA. This phenomenon is probably caused by the gradual hydrolysis of the bonded phase. However, more than 150 analyses can be carried out with an octadecylsilane cartridge with no important reduction in the performance of the column.

The temperature of the analysis was also studied in order to achieve the best resolution among the chromatographic peaks. Different temperatures between 40 and 70°C were tested and compared in terms of resolution. As a result of these experiments, the temperature was fixed at 65°C as all of the amine derivatives were well resolved.

The derivatization was also optimized by varying two variables: reaction time and volume of concentrated AccQ-Tag reagent. A modification of the derivatization system developed for amino acid compounds by Díaz *et al.* [34], was applied to achieve the best derivatization conditions. A 10- μ l volume of 1 mg l⁻¹ standard were automatically mixed with 6 μ l of borate buffer solution and with 0.5 μ l of reconstituted AQC reagent. Because the reaction takes place almost instantaneously, several experiments of between 1 and 5 minutes were carried out. The results of 10-min experiments were also considered and compared with the best responses of the 1-5-min experiments. The response of the amine derivatives at 1 min is very poor, so it is concluded that the reaction cannot be completed in such a short time. The responses increased with reaction time up to a maximum of 5 min. The sensitivity was no better at 10 min, confirming that the reaction was complete at 5 min.

Several micro-volumes ranging from 0.1 to 2 μl of the concentrated derivative reagent were also tested and compared by derivatizing samples that contained concentrations which were slightly higher than those which were found to be present in wines according to our previous experiments. The derivative responses decrease at volumes below 0.5 μl , maybe owing to the lack of accuracy of the injection needle at volumes close to its lower limit, do not increase at volumes over 0.5 μl and the excess of the reagent peak overlaps the peaks that elute near its retention time, so 0.5 μl of the AQC reagent were used to derivatize the samples injected.

Finally, the sample volume was also studied. Experiments were made at 1, 5, 10, 15 and 20 μl and the best results were obtained when 10 μl of sample were injected.

As Table 1 shows, the derivatization programme was optimized by repeating the mixing step twice. Here, the excess of the AccQ-Tag reagent is the limiting factor. As the peak of the reagent may overlap several peaks if it is increased, we must control its amount without decreasing the derivatization yield. The sample is homogenized with borate buffer and the AccQ-Tag reagent is added at the end. In this way, the derivatization reagent need not be added twice, as in previous studies [30].

The chromatogram that was obtained by automatically injecting a standard solution of 1 mg l^{-1} of the sixteen amines under the conditions specified above is shown in Fig 1. As can be seen, good resolution was obtained for the sixteen peaks, even when the excess of reagent in the middle of the chromatogram was taken into account. The reaction between AQC and the biogenic amines gave higher derivative responses than when derivatization was carried out with OPA, mainly for important amines such as cadaverine

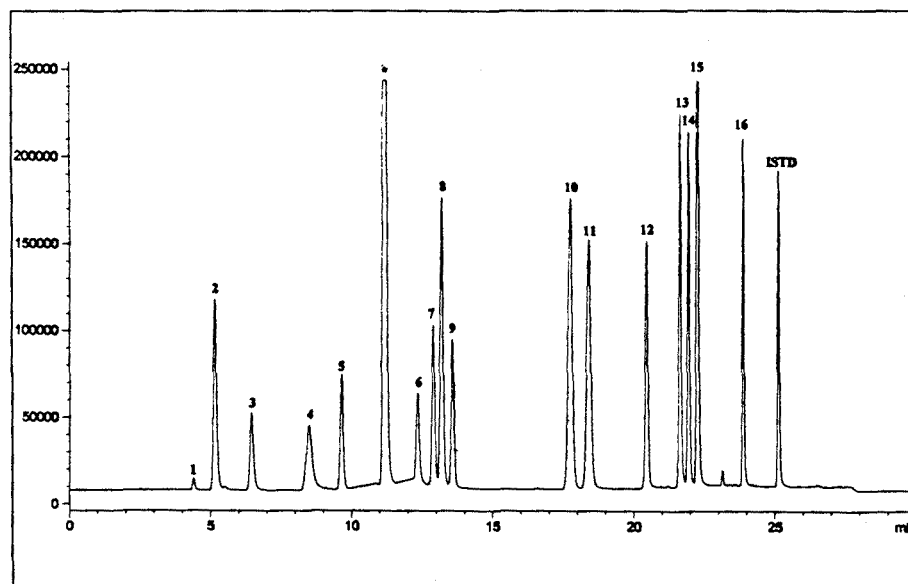


Figure 1. Optimum chromatographic separation of 1 mg l⁻¹ of the AQC-amine derivatives. 1: ammonia, 2: ethanolamine, 3: methylamine, 4: histamine, 5: ethylamine, 6: pyrrolidine, 7: isopropylamine, 8: propylamine, 9: tyramine, 10: butylamine, 11: putrescine, 12: cadaverine, 13: phenethylamine, 14: 3-methylbutylamine, 15: amylamine and 16: hexylamine. (0) Excess of AQC.

and putrescine. On the other hand, there is a change in the elution order for some amines. This change enables histamine to be determined more easily since it clearly elutes before the amino acid compounds, something which is not observed when OPA is used.

The precision and linearity of the pre-column derivatization method were then examined. Data obtained from three replicates with ten different concentrations (0.1-10 mg l⁻¹) of biogenic amine standards were used to establish calibration graphs for each amine. As in other studies [19, 29], heptylamine was used as the IS and was added at a level of 2 ppm. The calibration graphs were calculated by using either the peak area or the peak area adjusted for the incorporation of the IS as the dependent variable and

the concentration of the amines as the independent variable. Both sets of data gave good r^2 values. Five replicates of standards at concentrations between 0.5 and 5 mg l⁻¹ were then injected and quantified by using either the internal or the external standard quantification methods. Comparison of the results shows that there is no significant difference between them (less than 5% at all the concentration levels).

As the use of an ISTD did not improve the precision of the calibration graphs and the concentration results did not differ significantly, the external standard quantification method was adopted as it takes less analytical time.

As can be observed, the slopes, and therefore the sensitivity which mainly corresponded to the least polar compounds, increase with respect to those obtained with OPA derivatives [30].

The detection limit (see also Table 2) was calculated from the amount of amine required to give a S/N=3. As is shown, the detection limits improve considerably with respect to other methods [19, 29, 30], mainly for putrescine, iso and n-amylamine, phenethylamine and hexylamine because they reached 5 µg l⁻¹, as could be expected from their higher response factors. The highest detection limits belong to ammonia (50 µg l⁻¹), methylamine, histamine and pyrrolidine (20 µg l⁻¹), although they were also improved with respect to other previous methods.

As could be expected, the detection limits increased for wines. This could be ascribed to the matrix effect and not to the derivatization reaction, because the reaction was tested and the yields obtained were high (90-100%). These derivatization yields were determined by adding amine standards at 0.05, 1 and 10 mg l⁻¹ to the wine before the injection.

Amine	Slope	Error	Intercept	Error	r ²	LOD* (µg l ⁻¹)
ammonia	67788	3330	10807	633	0.991	50
ethanolamine	54458	913	12664	866	0.999	10
methylamine	54285	1240	23689	325	0.998	20
histamine	25717	951	6841	477	0.995	20
ethylamine	54817	1540	5634	490	0.998	15
pyrrolidine	23828	964	1897	163	0.999	20
isopropylamine	51761	964	2451	221	0.999	15
propylamine	79244	2770	2288	153	0.996	10
tyramine	37323	661	3620	318	0.999	15
isobutylamine	129359	4370	558	30	0.996	10
putrescine	125027	503	6511	592	0.995	5
cadaverine	91394	4600	977	109	0.993	10
phenethylamine	125874	4950	23158	2350	0.998	5
3-methylbutylamine	113398	9800	9838	1000	0.999	5
amylamine	200695	14800	46527	4420	0.988	5
hexylamine	98594	1620	5968	614	0.999	5

Table 2. Linearity of the fluorimetric detector response at 250 and 395 nm as excitation and emission wavelengths. Detection limit calculated from the amount of samines required to obtain S/N = 3. The errors of the slope and intercept have been calculated with the ULC computer programme [36]. Range of linearity: 0.05-0.10 to 10-20 mg l⁻¹. Detection limits of the amines in wines according to the S/N = 3 rule: 100 to 500 µg l⁻¹. * Limit of detection

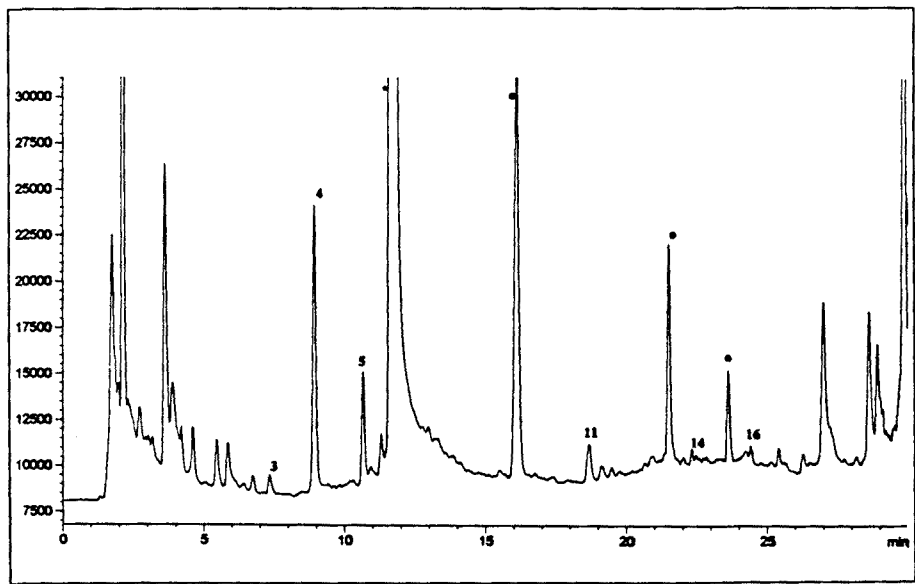


Figure 2. Example of a red wine processed with the analytical procedure described. 2: ethanolamine, 3: methylamine, 4: histamine, 5: ethylamine, 11: putrescine, 14: 3-methylbutylamine (closer to its LOD) and 16: hexylamine (closer to its LOD). Experimental conditions given in text. (o): Peak corresponding to the excess of AQC. (*) Unknown.

The method was used to determine biogenic amines in several wines from Tarragona. The samples were filtered through a 0.22 μm membrane filter before being injected into the chromatograph. Fig 2 shows the chromatogram of a sample of red wine analysed under the conditions discussed above. Although there are only a few chemical compounds that have native fluorescence in wines, there are many amino acids that can react, like amines, with AQC. As they are present in very high concentrations in wine, massive peaks are observed on the chromatogram, although the response of the amine derivatives is not affected. Further, the amino acids eluted during the first 5 min and, for this reason, they could not interfere with the analytes of interest.

The chromatogram of a typical sample of red wine shows that the amines were usually quite well resolved because of the selectivity of the fluorescence detection. The method was used to determine the amine contents of red, *rosé* and white wines from different D.O. in Tarragona (Table 3). As expected, the amine content was considerably lower in white

Amine	Red wines (n = 44)		Rosé wines (n = 8)		White wines (n = 14)	
	Range (mg l ⁻¹)	Median	Range (mg l ⁻¹)	Median	Range (mg l ⁻¹)	Median
Ethanolamine	3.24 - ND*	2.12	2.01 - ND	1.89	0.15 - ND	0.10
Methylamine	1.17 - 0.41	0.69	0.92 - 0.25	0.59	1.21 - ND	0.50
Histamine	13.50 - 0.66	5.13	5.18 - 0.46	2.48	3.46 - ND	1.15
Ethylamine	5.68 - ND	0.66	2.15 - ND	ND	0.60 - ND	ND
i-Propylamine	0.19 - ND	ND	0.28 - ND	ND	0.54 - ND	0.10
Propylamine	0.28 - ND	ND	0.11 - ND	ND	0.17 - ND	ND
Tyramine	ND	ND	ND	ND	0.33 - ND	ND
Putrescine	5.04 - ND	3.76	4.01 - 2.64	3.65	3.88 - 1.93	3.04
Cadaverine	0.71 - ND	ND	0.34 - ND	ND	1.43 - ND	ND
i-Amylamine	0.79 - ND	0.24	0.68 - 0.39	0.51	0.82 - 0.26	0.47
Hexylamine	0.96 - ND	ND	0.21 - ND	ND	0.40 - ND	ND

Table 3. Amine contents (mg l⁻¹) in wines from the Tarragona region. Results from triplicate direct injections of the samples. *ND means that amine was not detected under the conditions described in the text.

wines than in red wines. Histamine and putrescine were the most abundant amines, a finding which has also been reported in previous studies.

CONCLUSIONS

AQC reagent has been shown to be a good alternative for determining biogenic amines in wines. It enables primary and secondary amines to be determined simultaneously by giving stable derivatives for a manual derivatization to be carried out, if necessary, with no analyte loss. In this report these amines have been analysed by a fully automated method which gives better sensitivities for direct injection than those reported previously using OPA.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to thank CICYT (project ALI 94-0505) for the financial support given.

REFERENCES

- [1]. H. Suomalainen, L. Nykanen & K. Eriksson, *Am. J. Enol. Vitic.*, **25** (1974) 179
- [2]. D. Hornero and A. Garrido, *Analyst*, **119** (1995) 2037
- [3]. C.E. Daudt and C.S. Ough, *Am. J. Enol. Vitic.*, **31** (1980) 356
- [4]. M.J. Pereira Monteiro and A. Bertrand, *Bull. O.I.V.*, **765-766** (1994) 917
- [5]. S. Lafon-Lafourcade, *Connaiss. Vigne Vin*, **2** (1975) 103
- [6]. S. Yamamoto, S. Wakabayashi & M. Makita, *J. Agric. Food Chem.*, **28** (1980) 790
- [7]. N. Sayem-el-Daher, R. Simard & L. L'Hereux, *J. Chromatogr.*, **256** (1983) 313
- [8]. C.S. Ough and C.E. Daudt, *Am. J. Enol. Vitic.*, **32** (1981) 185
- [9]. I. Almy, C. Ough and E. Crowell, *J. Agric. Food Chem.*, **31** (1983) 911
- [10]. C.S. Ough, C.E. Daudt and E. Crowell, *J. Agric. Food Chem.*, **29** (1985) 938
- [11]. J.A. Zee, R.E. Simard, L. L'Hereux and J. Tremblay, *Am J Enol Vitic*, **34** (1983) 6
- [12]. H.M.L.J. Joosten and C.J. Olieman, *J. Chromatogr.*, **356** (1986) 311

- [13]. M.C. Gennaro and C. Abrigo, *Chromatographia*, **31** (1991) 381
- [14]. T. Bartók, G. Börcsök and F. Sági, *J. Liq. Chromatogr.*, **15** (1992) 777
- [15]. P. Lehtonen, *Z. Lebensm. Unters Forsch*, **183** (1986) 177
- [16]. J. Aerny, *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, **14** (1982), 713
- [17]. A. Ibe, K. Saito, M. Nakazato, Y. Kikuchi, F. Fujinuma, T. Nishima, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74** (1991) 695
- [18]. C. Buteau, C.L. Duitschaeffer and G.C. Ashtonf, *J. Chromatogr.*, **284** (1984) 201
- [19]. O. Busto, Y. Valero, J. Guasch and F. Borrull, *Chromatographia*, **38** (1994) 571
- [20]. C. Tricard, J.M. Cabazeil and M.H. Salagoity, *Analisis M.*, **19** (1991) 53
- [21]. K. Mayer and G. Pause, *Lebensm.-Wiss. Technol.*, **17** (1984) 177
- [22]. P. Lehtonen, M. Saarinen, M. Vesanto and M.L. Riekkola, *Z. Lebensm. Unters Forsch*, **194** (1992) 434
- [23]. C. Droz and H. Tanner, *Schweiz. Z. Obst- und Weinbau*, **119** (1983) 75
- [24]. R.E. Subden and R.G. Brown, *J. Chromatogr.*, **166** (1978) 310
- [25]. M. Calull, R.M. Marcé, J. Fàbregas & F. Borrull, *Chromatographia*, **31** (1991) 133
- [26]. H. Kouwatli, J. Chalom, M. Tod, R. Farinotti & G. Mahuzier, *Anal. Chim. Acta*, **266** (1992) 243
- [27]. E. Solon, J. Paz and J. Wilson, *J. Chromatogr.*, **398** (1987) 381
- [28]. D.L. Ingles, J.F. Back, D. Gallimore, R. Tindale and K.J. Shaw, *J. Sci. Food Agric*, **36** (1985) 402
- [29]. O. Busto, M. Mestres, J. Guasch and F. Borrull, *Chromatographia*, **40** (1995) 404
- [30]. O. Busto, J. Guasch and F. Borrull, *J. Chromatogr.*, **718** (1995) 309
- [31]. S. Allenmark, S. Bergström & L. Enerbäck; *Anal. Biochem.*, **144** (1985) 98
- [32]. M. Tod, J.Y. Legendre, J. Chalom, H. Kouwatli, M. Poulou, R. Farinotti and G. Mahuzier, *J. Chromatogr.*, **594** (1992) 386
- [33]. N. Nimura, K. Iwaki, T. Kinoshita, K. Takeda and J. Ogura, *Anal. Chem.*, **58** (1986) 2372
- [34]. J. Díaz, J. Lliberia, L. Comellas and F. Broto-Puig, *J. Chromatogr.*, **719** (1996) 171
- [35]. S.A. Cohen and D.P. Michaud, *Anal. Biochem.*, **211** (1993) 279
- [36]. R. Boqué and F.X. Rius, *J. Chem. Educ.*, **70** (1993) 230

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

CAPÍTULO VII

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

Según se indica en el anterior capítulo, el objeto del estudio presentado seguidamente ha sido mejorar los *LOD* que alcanza el AQC por inyección directa de las muestras (entre 100 y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, dependiendo de la amina). Para ello se ha recurrido a los conocimientos sobre extracción en fase sólida ya adquiridos.

El primer paso en este estudio ha sido suprimir aquellas aminas de las que no se habían encontrado indicios en el anterior estudio y que son menos citadas en la bibliografía. De esta manera se coincide con estudios como los realizados recientemente por algunos investigadores [1, 2] en los que sólo se consideran 8 aminas biógenas (metilamina, histamina, etilamina, tiramina, 1,4-diaminobutano o putrescina, 1,5-diaminopentano o cadaverina, β -fenetilamina e isoamilamina) como merecedoras de una atención particular desde el punto de vista analítico.

El proceso de derivatización coincide con el optimizado en el anterior trabajo, por lo que no entraremos en más discusiones al respecto.

A) OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN

Con objeto de reducir el tiempo de cromatograma, dado que se limita sustancialmente el número de analitos, se optimiza un nuevo gradiente de elución (de pendiente más pronunciada) empleando la misma fase móvil que en el trabajo descrito en el capítulo anterior.

Nuevamente, tendrá que tenerse en cuenta la presencia de los aminoácidos y del pico correspondiente al exceso de reactivo en los cromatogramas.

B) OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La extracción en fase sólida se ha aplicado nuevamente sobre las muestras de vinos con el fin de disminuir los límites de detección del método de derivatización de aminas biógenas con AQC. Para ello se ha partido de los mismos tipos de adsorbentes descritos hasta el momento y cuyas características recordamos ahora en forma de tabla:

Adsorbente	Características	Uso
Octadecilsilano, C ₁₈	Adsorbente apolar, poco selectivo debido a su gran versatilidad	Extracción de compuestos con grupos funcionales apolares. Extracción de pares iónicos
Triaminopropil, SAX	Intercambiador aniónico. Mal formador de pares iónicos	Extracción de aniones de muestras con fuerza iónica inferior a 0.1M
Propilbencenosulfonato, SCX	Intercambiador catiónico.	Extracción de cationes de muestras con fuerza iónica inferior a 0.1M

Tabla VII. 1. Características más relevantes de los sistemas de SPE aplicados durante el desarrollo experimental de la tesis doctoral presentada

Los dos factores más destacables a tener presentes en el momento de seleccionar un sistema de extracción en fase sólida para el vino es el pH de la muestra y la concentración elevada de polifenoles en la misma. Ambos parámetros han sido determinantes en muchos de los procedimientos propuestos en capítulos anteriores. Recordemos que el primero de ellos determinará la selección del adsorbente y el segundo entrará en competencia por la fase sólida con los propios analitos.

En este trabajo se ha considerado la posibilidad de combinar diferentes adsorbentes con algunos sistemas de concentración *off-line* como la evaporación en rotavapor a vacío o bajo corriente de nitrógeno. Asimismo, se ha estudiado la posibilidad de trabajar con los derivados de AQC puesto que, al igual que los dansilderivados, son estables durante largos periodos de tiempo.

Intercambiador aniónico fuerte

Se ensayaron tres procedimientos anteriores al que se propuso finalmente. El primero de ellos, basado en el estudio descrito en el capítulo IV, empleaba un SAX para eliminación de polifenoles a pH 8 y un C₁₈ para retención de las aminas previa formación de un par iónico con DeSA. El volumen de eluato recogido del segundo cartucho se concentró en el rotavapor a vacío y bajo corriente de N₂. Se obtuvieron pérdidas destacables de casi todas las aminas, no superándose en ningún caso el 25% de recuperación obtenido para la histamina en el rotavapor y el 20% de la putrescina en la evaporación bajo corriente de N₂ a pesar de trabajar en medio ácido.

Octadecilsilano

El segundo de los procedimientos ensayados consistió en la puesta a punto de un método que permitiera concentrar los AQC-derivados en un C₁₈. La derivatización de la muestra se realiza a pH básico, por lo que los polifenoles estarán en forma aniónica no adecuada para ser retenidos por la fase no polar. Los derivados, de características marcadamente apolares por la estructura del derivatizante, quedarán retenidos en el adsorbente, pudiendo ser eluidos selectivamente con MeOH en un paso posterior. La inyección directa del eluato nos indicó la presencia de numerosos picos desconocidos en el cromatograma que hacían difícil la cuantificación de las aminas. Las

subsiguientes pruebas de concentración en rotavapor y bajo corriente de N₂ resultaron infructuosas, aunque mejoraron ligeramente las obtenidas en el proceso anterior.

En el tercer proceso se combinaron dos cartuchos de octadecilsilano, el primero de ellos destinado a eliminar la interferencia de los polifenoles y el segundo a concentrar las aminas previa derivatización con AQC. Los cromatogramas en este caso resultaron limpios de interferencias, aunque los procesos de concentración posteriores tampoco resultaron adecuados para reducir los límites de detección del método de inyección directa debido al bajo porcentaje de recuperación de las aminas.

Intercambiador catiónico fuerte

Finalmente, el cuarto proceso aplicado ha consistido en la elución de las aminas retenidas en un SCX mediante una solución tampón de borato. A pesar de que el proceso normal de elución de cationes es el uso de un eluyente en medio ácido que neutralice la carga del adsorbente sustituyendo al analito desplazado (ver capítulo V), es posible también emplear un eluyente de elevada fuerza iónica que adsorba los analitos, arrastrándolos consigo hacia el final del cartucho. Esta alternativa se presenta como una atractiva alternativa al proceso descrito en el capítulo IV en el que, recordemos, no podían concentrarse ni putrescina ni cadaverina de forma simultánea al proceso de *clean-up* de la muestra.

El proceso de optimización del procedimiento propuesto se discute el artículo que se incluye seguidamente y cuya publicación ha sido aceptada en la revista *Journal of Liquid Chromatography*.

C) CONCLUSIONES

Entre las ventajas que presenta este método cabe destacar que con él se consiguen recuperar de forma cuantitativa y reproducible todas las aminas estudiadas, incluidas putrescina y cadaverina, las cuales habían quedado relegadas al uso de las Amberlite CG-50 como método de *clean up* y a su posterior concentración en rotavapor para ser cuantificadas a bajos niveles.

Los inconvenientes están ligados al derivatizante más que al proceso de extracción en fase sólida en sí. Entre estos inconvenientes cabría destacar la obtención cromatogramas complicados (similares a los obtenidos con derivatizantes como el FMOC) y la falta de estabilidad de la columna analítica.

Aunque quizá en el futuro se presente como una alternativa a otros derivatizantes más tradicionales, consideramos que en este momento está en fase experimental, dado que no se ha aplicado a gran variedad de muestras y, por tanto, no ha podido establecerse la posibilidad de que determinadas interferencias puedan influir seriamente en el resultado del análisis. Actualmente, y a pesar de que los resultados son prometedores, quizá sea aventurado considerarlo digno competidor del OPA.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. M.J. Pereira y A. Bertrand. *Bull OIV* 765-766:918 (1994)
- [2]. T. Bauza, A. Blaise, J.P. Mestres, P.L. Teidresse, F. Daumas y J.C. Cabanis. *Sci Aliment* 15:367 (1995)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY

J Liq Chromatogr, in press

SOLID-PHASE EXTRACTION OF BIOGENIC AMINES FROM WINE BEFORE CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF THEIR AQC-DERIVATIVES

O. Busto^a, M. Miracle^a, J. Guasch^a and F. Borrull^b

^aDepartament de Química, Unitat d'Enologia del Centre de Referència de Tecnologia d'Aliments
(CeRTA) de la Generalitat de Catalunya. Escola d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili
Avda. Ramón y Cajal, 70. 43005 Tarragona, Spain

^bDepartament de Química, Facultat de Química, Universitat Rovira i Virgili, Pça. Imperial Tàrraco, 1
43005 Tarragona, Spain

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

SOLID PHASE EXTRACTION OF BIOGENIC AMINES FROM WINE BEFORE CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF THEIR AQC- DERIVATIVES

Key Words: Biogenic amines, wine, 6-aminoquinolyl-n-hydroxy-succinimidyl carbamate (AQC), solid-phase extraction

ABSTRACT

This paper describes a method for determining the most important biogenic amines in wines. It uses reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with gradient elution and fluorimetric detection performed on the amines after precolumn automatic derivatization with 6-aminoquinolyl-n-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC). Solid phase extraction (SPE) with strong cation exchanger (SCX) cartridges was used prior to derivatization to improve the selectivity and to reduce the detection limits (LOD) of the method.

The overall method was used to determine the aforementioned amines in red wines from the Tarragona region.

INTRODUCTION.

Biogenic amines are alkaline, aliphatic and heterocyclic compounds whose negative presence in food has been well documented [1-6]. These compounds can be found in the raw material by above all they are found in the fermented products, as a result of the decarboxylation of their precursor amino acids [7, 8].

In the last two decades the determination of the content of biogenic amines in food products has become more and more important. Increasing interest in producing processed food that meet the quality that comply with import and exportation laws, have promoted research into these areas.

Biogenic amines are compounds formed during the fermentative processing of foods. Several authors have proved that for grapes and wines they appear during the malolactic fermentation, which is the main reason why red wines have higher quantities than white wines.

Historically, a major problem with biogenic amines identification/quantitation in wines has been the lack of a sensitive analytical technique. Many reports have introduced derivatizing agents and/or other sample treatments to overcome the problems that wines, especially red wines, show because of their matrix complexity. So, many analytical reagents have become popular among wine researchers. Orthophthaldialdehyde (OPA) [7, 9-21], the derivatizing agent that enhances both the selectivity as well as the sensitivity of the method when working with HPLC, has been adopted as the best of the agents used, and is at present the method adopted by the *Office International de la Vigne et du Vin* (OIV) for the standard validation of an analytical method [22].

Nevertheless, various shortcomings are also described in all of the reports written on this subject as we have pointed out in a previous paper [23]. A new derivatizing agent, AQC, overcomes most of these limitations, although its use with different samples is still being studied [24].

Furthermore, solid-phase extraction is a useful technique that commonly cleans-up and concentrates the analytes by reducing the sample pretreatment which is normally necessary when using other techniques such as liquid-liquid extraction (LLE). To enrich aqueous amine samples many sorbents including, C18 and strong and weak cation exchangers, have been

tested and compared [26]. Although C18 is the most popular sorbent used for extracting organic compounds from aqueous samples, when amines have to be isolated the best results are obtained by using weak cation exchangers such as Amberlites [10, 18, 27]. Nevertheless, C18 recoveries can be improved by modifying the polarity of the amines either by derivatizing [28] or by reacting them with suitable ion pair reagents [25].

The aim of this work is to provide a fast analytical method for the simultaneous determination of eight undesirable biogenic amines such as histamine, cadaverine, putrescine, iso-amylamine, tyramine, β -phenethylamine, ethylamine and methylamine, all of them correlated with one another in terms of synergistic toxicity. They are isolated from the main matrix with a strong cation exchanger (SCX), eluted with an optimized solvent mixture and finally chromatographed after AQC automatic derivatization in order to test an alternative procedure to the well-known OPA derivatization.

This method has been used to determine the above-mentioned amines in several red wines from the Tarragona region.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

The 8 amines studied were: methylamine, histamine, ethylamine, tyramine, putrescine, cadaverine, β -phenethylamine and 3-methylbutylamine (iso-amylamine) all of which were supplied by Aldrich-Chemie (Beerse, Belgium). An individual standard solution of 2000 mg l⁻¹ of each amine was prepared in HPLC-grade methanol (Scharlau, Barcelona, Spain) and stored in darkness at 4°C. More diluted solutions used in the calibration

and SPE studies were prepared by diluting these standard solutions with Milli-Q water.

The methanol (MeOH), acetonitrile (ACN) and tetrahydrofuran (THF) used in the chromatographic and the extraction method were HPLC grade (Scharlau). The water used for more diluted solutions was of Milli-Q quality (Millipore, Bedford, USA). The sodium acetate reagent (NaAc, HPLC grade) was also supplied by Scharlau. For the automatic derivatization method the AccQ-Fluor Reagent Kit (Waters, Milford, U.S.A.) was used.

Equipment

A Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany) model 1050 HPLC equipped with an HP 1046A programmable fluorescence detector was used to perform the chromatographic experiments. The samples were derivatized and injected with an HP Series 1050 automatic injector. Separation was performed using a thermostatted Spherisorb ODS-2 cartridge (250 x 4.6 mm I.D., particle size 5 μ m) preceded by a guard-column both heated to 65°C and supplied by Hewlett-Packard. Chromatographic data was collected and recorded on an HP ChemStation version A.01.01.

SPE experiments were performed using a Visiprep™ DL Disposable Liner Solid Phase Extraction Vacuum Manifold with 12 individual flow control valves from Supelco (Bellefonte, USA).

High-performance liquid chromatographic method

Two solvent reservoirs containing (A) 1% THF and 0.05M NaAc in Milli-Q water and (B) MeOH were used to perform the optimized gradient programme which began with 5 min of isocratic elution at 35% of MeOH followed by a 7 min linear gradient from 35 to 100% (v/v) methanol. Then, the programme had three additional min at 100% of MeOH as a clean-up

step and then 2 min to reach the initial conditions and stabilise the corresponding mobile phase. Determination was at a flow-rate of 1 ml min⁻¹. The AQC-derivatives eluted were detected by monitoring their fluorescence using 250 nm and 395 nm as the wavelengths of excitation and emission respectively. Under these conditions all 8 amines were eluted in less than 13 min.

Derivatization

The derivative reagent was formed by reconstituting the 6-aminoquinolyl-n-hydroxy-succinimidyl carbamate powder with 1 ml of acetonitrile. The alkalinity needed to perform the derivatization was obtained with the borate buffer supplied by Waters in its Fluor Reagent Kit (AccQ-Tag™).

The derivatization was fully automated by means of an injector program. The injection system mixed the reagents automatically, drawing the AQC reagent, the borate buffer and the sample sequentially into the injection needle. The steps in the derivatization sequence have been specified in a previous paper [23].

Solid-phase extraction

In order to simultaneously clean-up and concentrate the sample, solid-phase extraction was carried out with the sulphonic acid cation exchanger (SCX cartridges, 500 mg) supplied by Varian (Harbor City, USA).

The solid-phase extraction consisted of a prior step to condition the cartridge by rinsing it with two fractions of 3 ml of methanol. Then, it was rinsed with two fractions of 3 ml of 0.1 mM HCl. The sample was then passed through the conditioned cartridge, washed with 3 ml of 0.1 mM HCl and eluted with two fractions of 1 ml of 75 mM borate in 50% (v/v) MeOH

(2.86 g of sodium tetraborate decahydrate was dissolved with distilled water in a 100 ml volumetric flask and then 50 ml of this solution was diluted to 100 ml with MeOH). This step has been optimized according to the procedures described in the following section.

RESULTS AND DISCUSSION

After derivatization according to the procedure previously reported [23], the chromatographic gradient elution was optimized to obtain good resolution between the peaks in a shorter analysis time with no interference from the more polar compounds usually present in the analysis of real samples. Figure 1 shows the optimum separation of a 5 mg l⁻¹ standard mixture of the 8 amines studied, after derivatization with the AQC reagent. All of the amines were well resolved and there was no interference from the peaks corresponding to the derivatization reagents and other system peaks. Ten identical standard samples were derivatized using this procedure. Between-day reproducibility for retention times was excellent (always lower than 1%, average R.S.D. = 0.46%).

In order to verify the linearity of the response of the different derivatives at the previously specified wavelengths for the working concentration, standard solutions of amines that ranged between 0.1 and 15 mg·l⁻¹ were prepared and injected. Calibration graphs of each amine were constructed by plotting the amine peak-area against the amine concentration. Linear least-squares regression was used to calculate the slope, the intercept, the correlation coefficient (r^2) and the LODs. All the calibration lines showed ranges of linearity ($r^2 > 0.995$) between 0.20-0.50 and 10-20 mg l⁻¹. The LODs were calculated by direct injection of the amines

temporarily avoided by flushing the chromatographic system with ACN every ten injections.

The method was first applied to the analysis of wines which had not been subject to any special treatment. In this case, they were only filtered through a 0.45 μm nylon membrane.

Figures 2a and 2b show an example of a red wine which was analyzed with and without standard addition about 2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ of each of the biogenic amines. It can be seen that the most polar compounds, such as amino acid derivatives, did not interfere with respect to the peaks corresponding to the compounds studied.

Figure 2a shows that histamine can be determined directly without interferences from amino acids. This is highly interesting since it is one of the limitations of the commonly used OPA. However, the rest of the compounds can only be identified because their concentrations are near the detection limits of the method. On the other hand, tyramine cannot be identified in this sample.

In order to decrease the matrix effect and to determine these amines at low concentration levels, a solid-phase extraction technique was studied. In previous papers, SPE with C18 cartridges was used to this end, but some tedious steps such as pH adjustment and the use of an ion-pair reagent [25] was necessary in order to obtain good results.

We reported in a previous study [21] that biogenic amines in wines can be preconcentrated using SPE with SCX as strong cation exchanger and HCl in MeOH as eluent. The recoveries ranged between 75 and 100% for all the amines except for two of the most important amines present in wines, putrescine and cadaverine, the recoveries of which were 35% and less than 10% respectively.

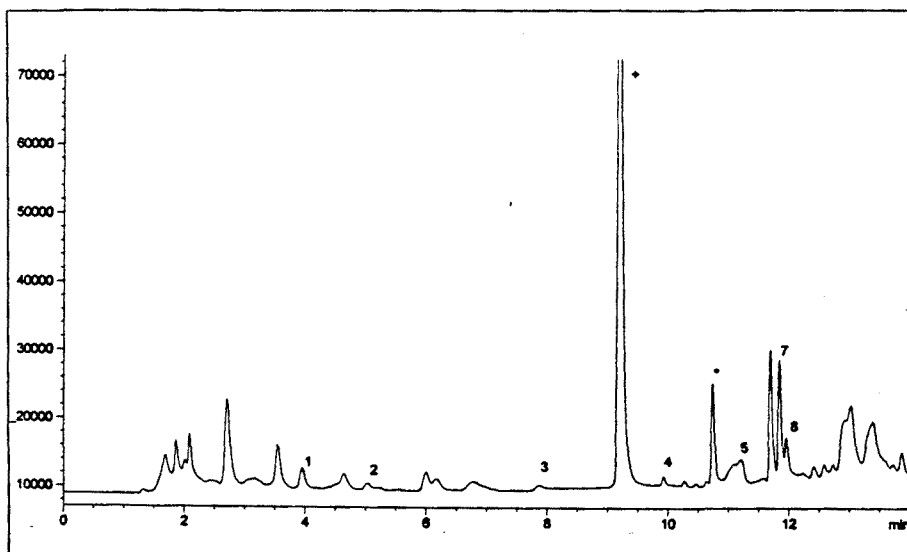


Fig. 2a

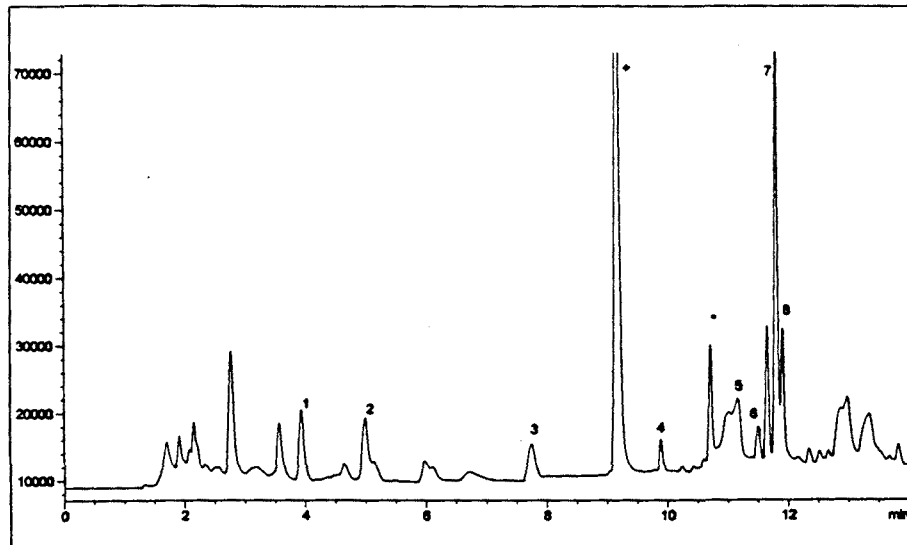


Figure 2.- Chromatogram of red wine and the same sample spiked with a standard solution at a final concentration of 2 mg l^{-1} of the amines studied: a) red wine and b) red wine spiked with the standard solution. For peak assignation, see fig. 1.

To improve this extraction method several buffer solutions and organic solvents were tested. The best results were obtained with 75mM borate solution in MeOH 50/50 v/v.

Attempts to increase the percentage of methanol failed because the borate was not very soluble in methanol at concentrations higher than 50%. Furthermore, lower borate concentrations (25 mM and 50 mM) gave poor amine recoveries, even if the percentage of methanol was increased. So, the above mentioned concentration was chosen as a compromise between the percentage of organic solvent and the ionic strength, since neither of them can be increased without precipitating the salt. Under these conditions, the results obtained after preconcentrating 15 ml of a red wine fortified with 0.3 mg l⁻¹ of each of the biogenic amines and eluted with 1 ml of the optimized eluting solution are shown in table I.

As can be seen, putrescine and cadaverine were now well recovered (100%). The recovery of the rest of the amines varied between 80% and 100%, except for methylamine, whose recovery was 70%. So, as well as 3-methylbutylamine and cadaverine, this method also recovered histamine, tyramine and putrescine, which are present in larger quantities in wines.

Amine	R (%)	R.S.D.
methylamine	70	8.7
histamine	100	4.1
ethylamine	85	5.1
tyramine	100	4.4
putrescine	100	4.0
cadaverine	101	3.9
β-phenethylamine	80	5.7
3-methylbutylamine	100	5.7

Table I. Recovery (R) and relative standard deviation (R.S.D.) of eight biogenic amines extracted from red wine by solid phase extraction. Results from triplicate analysis of 15f red wine spiked with 500 µg.l⁻¹ of the amines. The baseline is determined from the same wine spiked with methanol instead of amines

Fig. 3a shows the results of the SPE applied to the wine the chromatogram of which can be seen in Fig. 2a, whereas Fig. 3b gives the chromatogram resulting from the same treatment of the fortified wine. There is a decrease in the most polar peaks that appeared at the beginning of the chromatogram as well as the decrease in other system peaks that interfere in the determination of the analytes.

In this wine, in addition to the histamine, methylamine, putrescine, cadaverine, β -phenethylamine and 3-methylbutylamine could also be easily determined after SPE. On the other hand, ethylamine coelutes with another peak, which this treatment removes, although tyramine cannot be identified.

The LODs of the method were determined using the S/N ratio = 3 [23] for all compounds in a fortified red wine. The LODs determined ranged between $20 \mu\text{g l}^{-1}$ for β -phenethylamine and 3-methylbutylamine and 0.1 mg l^{-1} for methylamine. The repeatability was close to 10% for all the amines and the reproducibility was close to 15%.

Attempts to decrease the detection limits result made sample preparation more difficult because an off-line concentration method, such as rotary evaporation of the eluates or concentration under nitrogen steam, had to be added. Experiments to evaporate samples under vacuum failed to recover for most of the amines analysed. Neither did concentration under nitrogen steam increase the efficiency of the treatment.

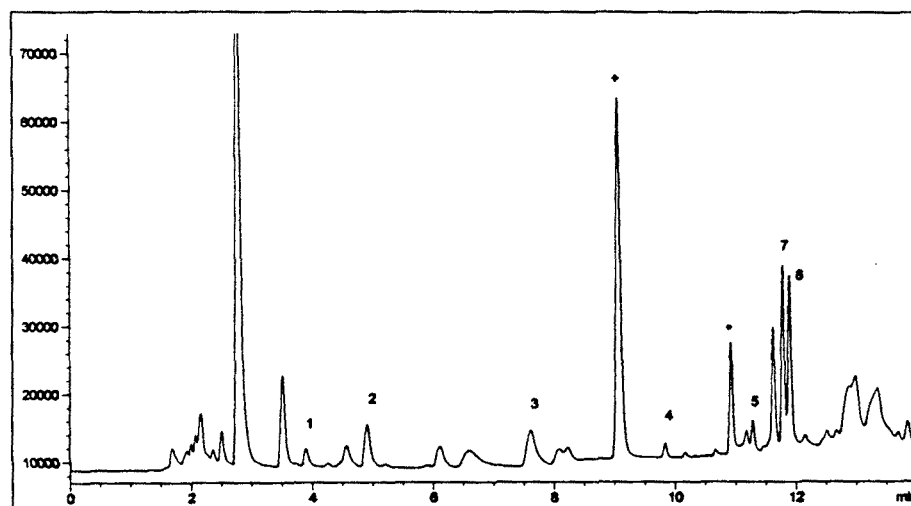


Figure 3a

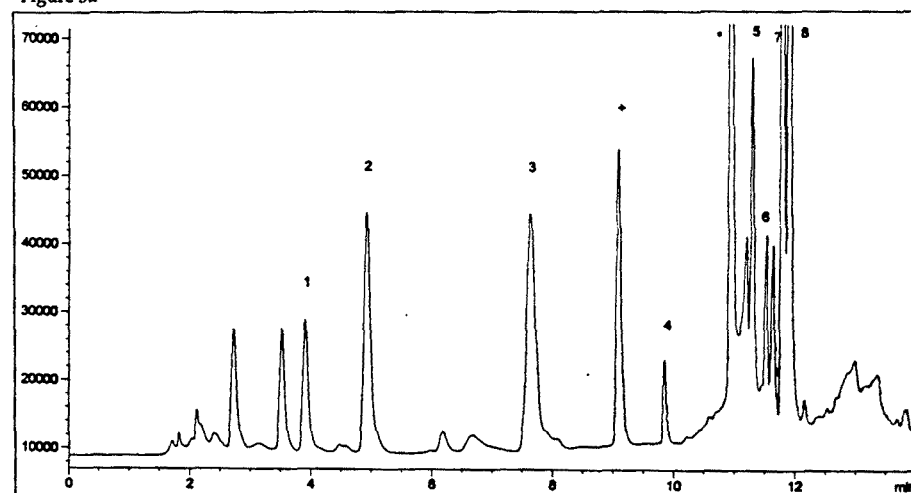


Figure 3. Chromatograms showing the difference when the SPE procedure is applied. 3a) Shows the wine given in fig. 2a after SPE; 3b) Shows the same wine spiked with 0.3 mg I¹ and processed with the analytical procedure described. For peak assignment, see fig. 1.

Name	Concentration range	Median
histamine	5.3 - 7.8	6.3
putrescine	3.3 - 4.8	4.4
3-methylbutylamine	0.1 - 0.2	0.1
methylamine	0.7 - 0.8	0.8
ethylamine	0.2 - 0.6	0.5
cadaverine	0.5 - 0.7	0.6
β -phenethylamine	0.5 - 0.6	0.6
tyramine	ND	-

Table II. Analysis of 15 red wines. Concentration in mg l⁻¹.
Results from SCX extraction of the wines.

This method was applied to fifteen red wines belonging to different varieties from Tarragona. Results obtained for the SCX concentration are shown in table II.

CONCLUSIONS

The HPLC system described enables biogenic amines to be determined in wines with good sensitivity and specificity. By means of automatic pre-column AQC-derivatization and fluorescence detection, appropriately coupled with a prior SCX extraction, eight amines can be quantified at low levels. SCX cartridges again proved to be adequate to clean-up the wine samples while retaining biogenic amines so enabling the samples to be simultaneously concentrated.

Recoveries have been improved in comparison with other studies and the concentration step has been optimized allowing these compounds to be detected at low levels with no interference from other compounds such as amino acids.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to thank CICYT (project ALI 94-0505) for financial support given.

REFERENCES

- [1]. W. Lovenberg. J. Agr. Food Chem. 22: 23-26 (1974)
- [2]. J. Stratton, R. Hutkins and S. Taylor. J. Food Protection 54 : 460-470 (1991)
- [3]. E. Mentasti, C. Sarzanini, O. Abollino and V. Porta. Chromatographia 31: 41-49 (1991)
- [4]. W.J. Hurst. J. Liq. Chromatogr. 13: 1-23 (1990)
- [5]. K. Mayer. OIV FV 466 (1974)
- [6]. J. Aerny. OIV FV 881 (1990)
- [7]. M.C. Ingargiola and A. Bertrand. OIV FV 896 (1991)
- [8]. M.C. Vidal and A. Mariné. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 25: 59-75 (1983)
- [9]. C. Tricard, J.M. Cabazeil & M. H. Salagoity. Analisis M. 19: 44, 53-54 (1991)
- [10]. S. Lafon-Lafourcade. Connaissance VigneVin 9: 103-115 (1975)
- [11]. K. Mayer and G. Pause. OIV FV 781 (1984)
- [12]. K. Mayer and G. Pause. Lebensm. -Wiss. u. Technol. 17: 177-179 (1984)
- [13]. C. Droz & H. Tanner. Schweiz. Z Obst- und Weinbau 119: 75-77 (1983)
- [14]. P. Lehtonen, M. Saarinen, M. Vesanto and M. Riekkola. Z. Lebensm. unters. Forsch. 194: 434-437 (1992)
- [15]. R.E. Subden, R.G. Brown and A.C. Noble. J. Chromatogr. 166: 310-312 (1978)
- [16]. C. Buteau, CL Duitschaeffer & GC Ashton. Am J Enol Vitic. 35: 228-236 (1984)
- [17]. K. Mayer and G. Pause. OIV FV 466 (1973)
- [18]. B. Plumas and C. Sautier. OIV FV 442 (1973)
- [19]. S. Lafon-Lafourcade. OIV FV 499 (1974)
- [20]. Ch. Tricard and J.M. Cabazeil. OIV FV 850 (1990)
- [21]. O. Busto, M. Mestres, J. Guasch and F. Borrull. Chromatographia 40: 404-410 (1995)
- [22]. M.J. Pereira and A. Bertrand. Bull. OIV. 765-766: 918-962 (1994)
- [23]. O. Busto, J. Guasch and F. Borrull, J. Chromatogr., in press
- [24]. J. Díaz, J.Ll. Lliberia, L. Comellas and F. Broto-Puig, J. Chromatogr. 719: 171-179 (1996)
- [25]. O. Busto, J. Guasch and F. Borrull. J. Chromatogr. 718: 309-318 (1995)
- [26]. P. Jandera, K. Ventura, R. Hlandorniková and J. Churáček. J. Liq. Chromatogr. 17: 69-95 (1994)
- [27]. A. Ibe, K. Saito, M. Nakazato, Y. Kikuchi, F. Fujinuma, T. Nishima. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74: 695-698 (1991)
- [28]. O. Busto, Y. Valero, J. Guasch and F. Borrull. Chromatographia 38: 571-578 (1994)

CAPÍTULO VIII

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

Las limitaciones que presenta la derivatización con AQC en términos de complejidad de los cromatogramas y de escasa estabilidad de las columnas de C_{18} , convierte este derivatizante en un producto de interés restringido al campo de la investigación analítica. A pesar de haberse utilizado con éxito, su aplicación práctica en estos momentos es cuando menos discutible, siquiera desde el punto de vista enológico.

En este octavo capítulo recuperamos la derivatización con OPA mediante un sistema *on line* diferente del empleado en los capítulos IV y V. Son los buenos resultados de sensibilidad que se obtienen con este reactivo, así como su sencillez de aplicación y su bajo coste, los motivos principales por los que seguimos trabajando en este sentido.

Dado que la reacción con OPA se da de manera prácticamente instantánea a temperatura ambiente proporcionando derivados muy inestables, el método parece estar hecho a medida para realizar una derivatización *on column* inmediatamente después de inyectar la muestra en la columna analítica.

La cinética de reacción del OPA es, como hemos visto anteriormente, lo suficientemente rápida como para, en pocos segundos, obtener isoindoles altamente fluorescentes. El encarecimiento que supone para el equipo de HPLC la adquisición de un sistema de inyección automático o de un sistema de bombas de gradiente puede suponer, en algunos casos, la apuesta por métodos menos sensibles pero más económicos, especialmente en los laboratorios enológicos. No olvidemos que los métodos de control de calidad de los alimentos que se emplean en análisis rutinarios se han desarrollado a expensas de requerimientos fundamentalmente comerciales.

Saito y col. han aplicado satisfactoriamente el sistema de derivatización *on column* al análisis de histamina, tiramina, 1,3-diaminopropano, putrescina,

espermidina, espermina, cadaverina y trietilentriamina, mediante un proceso en el que las aminas se inyectan automáticamente, derivatizándose de forma espontánea al entrar en contacto con la fase móvil e introduciéndose en la columna ya transformadas en los isoindoles respectivos [1].

Estas perspectivas son prometedoras para plantearse la investigación de un método que permita, mediante derivatización con OPA *on column*, la determinación de las aminas biógenas mayoritarias en muestras de vinos.

A) OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN Y DERIVATIZACIÓN

Para efectuar la optimización de la separación se ha utilizado una adaptación de las condiciones de derivatización empleadas por Saito en un trabajo anterior [2].

El factor determinante en el proceso es la columna analítica. En estudios precedentes hemos indicado que uno de los problemas que presentan los trabajos con OPA o AQC es el pH de la fase móvil, demasiado elevado para evitar la insolubilización, lenta pero continuada, de la sílice que soporta la fase estacionaria. Por lo tanto, si la fase móvil tiene que mostrar un pH marcadamente alcalino para que la reacción de derivatización pueda darse *on line*, la columna tiene que permanecer inalterable por el paso del eluyente. Esto solamente se consigue con columnas de base polimérica, las cuales permiten la utilización de tampones acuosos en un rango de pH entre 2 y 13, sin acortarse la vida útil de la misma. La aplicación de estas columnas es algo realmente eficaz en la analítica de las aminas biógenas, dado que permite alargar considerablemente la vida de las columnas, permitiendo además aumentar la precisión del análisis.

En general, el uso de las columnas de base polimérica presenta diferencias en función del fabricante de acuerdo con nuestra experiencia. Así, se encuentran columnas que admiten MeOH en la fase móvil y otras, como la empleada en este trabajo, que aconsejan trabajar solamente con mezclas de ACN y/o THF en soluciones acuosas, respetando siempre un máximo de concentración de tampón en la fase móvil, de agua o de disolvente orgánico, con el fin de optimizar la resolución y la simetría de los picos (siempre en función del analito).

También hay diferencias respecto al flujo de fase móvil adecuado para conseguir la máxima resolución, teniendo algunas columnas un margen muy restringido como consecuencia de los aumentos incontrolados de la presión del sistema y otras (como la Asahipak utilizada en este estudio) un margen mucho más amplio.

La temperatura es otra de las variables que es necesario controlar, dado que muchas de las columnas no admiten valores superiores a los 60°C, valor ligeramente inferior al que soportan las de base sílice.

Finalmente, hay que respetar algunas condiciones básicas de mantenimiento como la de introducir un tampón orgánico en su interior durante la noche, si la columna está destinada al análisis rutinario u otras normas semejantes a las de otro tipo de columna.

Todo el proceso de optimización de las variables que influyen o pueden influir en la reacción de derivatización se halla detalladamente descrito en el artículo anexo a continuación y que ha sido aceptado para su publicación en la revista *Journal of Chromatography*. No se han encontrado problemas o dificultades adicionales a los allí recogidos, por lo que no consideramos procedente extendernos más en la discusión.

B) ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA DE LA MATRIZ. DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN

El estudio de la influencia de la matriz ha merecido un interés especial en este último trabajo. Dado que el proceso de derivatización sobre la muestra debe realizarse *on line*, sin homogeneización previa, se ha considerado procedente estudiar la influencia que sobre esta derivatización y la posterior separación puede ejercer la inyección de patrones de aminos preparados en diferentes matrices.

Son frecuentes los estudios que utilizan la preparación de un vino sintético para cuantificar los analitos de interés en matrices que emulan las condiciones de la muestra problema. Algunos autores consideran suficiente la preparación de una simple solución hidroalcohólica al 40% que diluyen sucesivamente hasta obtener los patrones deseados [3]. Otros, por el contrario, juzgan interesante reproducir más concretamente la matriz del vino, introduciendo además del etanol, glucosa, ácido cítrico, ácido tartárico, glicerol y ácido acético, entre otros elementos [4].

Aunque no parece primordial la interferencia que la matriz aporta, dado el elevado número de investigadores que trabajan con patrones en solución acuosa u orgánica para efectuar el calibrado del método [5, 6], se ha introducido el estudio del efecto de la matriz sobre el análisis cuantitativo de las aminos biógenas consideradas en este capítulo. Existe un interés creciente hacia la determinación exacta (o lo más exacta posible) de su límite de detección en el vino, ya que la normativa de mercado que la OIV (y por extrapolación la Unión Europea) fije finalmente para su comercialización, presumiblemente se basará en algunas de las aminos analizadas en este trabajo.

Límites de detección

La determinación de los *LOD* en cromatografía es un tema de difícil solución, sobre todo si tenemos en cuenta que en muestras biológicas en las que los analitos son componentes naturales, no es fácil obtener un blanco analítico de las mismas características que la matriz de trabajo. En el caso de las aminas biógenas en vinos, es especialmente complicado determinar el límite de detección de aminas como la histamina, que suele aparecer en todos los vinos en mayor o menor grado de concentración. Así, prácticamente en todos los trabajos que se indican los *LOD* de las técnicas cromatográficas empleadas éstos son calculados sobre patrones cromatográficos de aminas biógenas, ignorando el efecto que la matriz provoca y que se traduce normalmente en un incremento de los mismos, como nos indica nuestra experiencia.

Debido a la importancia que ha adquirido en los últimos años el análisis de trazas, la determinación del límite de detección en cromatografía se ha convertido en algo imprescindible. La *American Chemical Society* en 1985 definió el límite de detección como la cantidad de analito que produce una señal igual a tres veces la desviación estándar de la señal del blanco analítico [7]. Una definición posterior más generalista dice, no obstante, que el límite de detección es aquel nivel de concentración que puede considerarse estadísticamente diferente de la señal del blanco [8]. Es aquí donde radica el problema fundamental de la cromatografía del vino, ya que es difícil obtener un blanco analítico del mismo.

Basándonos en las recomendaciones de la *IUPAC* [9], que define este blanco en relación con la mínima detectabilidad en función de la señal y el ruido de salida de un instrumento, en este caso el detector, se ha intentado conseguir

una solución libre de aminos para poder establecer la comparación correcta entre los patrones preparados en ACN y el vino, tanto real como sintético.

Apoyándonos en los resultados de extracción en fase sólida descritos en anteriores capítulos, se ha considerado la posibilidad de extraer de un vino tinto la máxima cantidad de aminos. Se han ensayado dos procesos. El primero de ellos emplea la Amberlite CG-50, el segundo y finalmente aplicado, ha sido el de la retención mediante un SCX, dado el alto poder de adsorción de amino compuestos mostrado anteriormente. Efectivamente, el SCX retiene el 100% de las aminos naturales en el vino. De esta forma, pasando una pequeña cantidad de muestra a través del SCX (para no superar su volumen máximo admisible), se eliminan las aminos y se obtiene una matriz que puede considerarse como blanco analítico en términos de aminos.

Sobre esta matriz pueden efectuarse entonces adiciones de patrones de aminos y, recurriendo al criterio de obtener la señal analítica que cumpla el criterio $S/N = 3$, podrá determinarse de forma más precisa el límite de detección real de la técnica y/o del método aplicados. De la misma manera puede procederse para establecer la linealidad de la respuesta y el máximo valor de esta linealidad.

De la comparación de resultados, se llega a la conclusión de que es perfectamente admisible el trabajo con vinos sintéticos e incluso con patrones, aunque, como siempre, la inmensidad de los vinos es que no hay dos iguales, por lo que sería procedente contrastar estos resultados con vinos producidos en otras zonas.

A pesar de ello, los resultados son satisfactorios desde el punto de vista analítico porque se soluciona, de forma práctica, el problema de la

determinación del límite de detección de aminos biógenos en vinos reales, por lo menos desde el punto de vista más habitual entre los cromatografistas.

C) CONCLUSIONES

De este estudio pueden considerarse ventajas sustanciales la simplificación instrumental del equipo de *HPLC*, dado que es posible prescindir del inyector automático para la derivatización con OPA, así como la posibilidad (no estudiada) de trabajar en sistema isocrático de elución. Efectivamente, de la observación de los cromatogramas incluidos en el artículo, se desprende la conclusión de que pueden efectuarse varias eluciones isocráticas independientes, en función de la amina que se desee determinar.

Entre los inconvenientes destacar el reducido número de aminos analizado en un tiempo de cromatograma relativamente elevado en comparación con otros procedimientos. Por otro lado, cabría seguir trabajando en el perfeccionamiento de este sistema, con el fin de evitar las distorsiones de línea base que llevan asociados los cambios de polaridad de la fase móvil como consecuencia de la variación de la fluorescencia de fondo.

Seguidamente se incluye el artículo enviado al *Journal of Chromatography*. En él se recogen, como ya se ha indicado, las experiencias realizadas para optimizar este nuevo procedimiento de determinación de aminos biógenos en vinos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. K.Saito, M. Horie, K. Nakagomi y H. Nakazawa. *Anal Sci* 8:675 (1992)
- [2]. K. Saito, M. Horie y N. Nose. *J Chromatogr* 595:163 (1992)
- [3]. M.J. Pereira y A. Bertrand. *Bull OIV* 765-766:918 (1994)
- [4]. M.C. Vidal. *Ph D.* p. 186. Universitat de Barcelona (1987)
- [5]. P. Lehtonen, M. Saarinen, M. Vesanto y M.L. Riekkola. *Z Lebensm Untersch Forsch* 194:434 (1992)
- [6]. C. Tricard, J.M Cabazeil, M.H. Salagoity. *Analisis M* 19:53 (1991)
- [7]. J.E. Knoll. *J Chromatographic Sci* 23:422 (1985)
- [8]. P.L. Bonate. *J Chromatographic Sci* 28:559 (1990)
- [9]. Y. Hayashi, R. Matsuda y R.B. Poe. *Chromatographia* 41:66 (1995)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Química



Tesis Doctoral

ESTUDIO SOBRE LA
DETERMINACIÓN DE AMINAS
BIÓGENAS EN VINOS POR *HPLC*

OLGA BUSTO BUSTO

Tarragona, 1996

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

J Chromatogr A, in press

DETERMINATION OF EIGHT BIOGENIC AMINES IN WINES BY HPLC WITH ON COLUMN FLUORESCENCE DERIVATIZATION

O. Busto^a, M. Miracle^a, J. Guasch^a and F. Borrull^b

^aDepartament de Química, Unitat d'Enologia del Centre de Referència de Tecnologia d'Aliments
(CeRTA) de la Generalitat de Catalunya. Escola d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili
Avda. Ramón y Cajal, 70. 43005 Tarragona, Spain

^bDepartament de Química, Facultat de Química, Universitat Rovira i Virgili, Pça. Imperial Tàrraco, 1
43005 Tarragona, Spain

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

DETERMINATION OF BIOGENIC AMINES IN WINES BY HPLC WITH ON-COLUMN FLUORESCENCE DERIVATIZATION

Key Words: Biogenic amines, on-column fluorescence derivatization, *o*-phthalaldehyde, HPLC, Solid-Phase Extraction, wine

ABSTRACT

An on-column fluorometric derivatization method was developed for determining eight biogenic amines by HPLC and fluorimetric detection. The derivatization was carried out by pumping the *o*-phthalaldehyde reagent through the column together with other solvents used as mobile phases. The on-column reaction conditions (pH, borate and *o*-phthalaldehyde concentrations) were optimized. The matrix effect, the thiol used in the derivative reagent and the effect of the temperature on the separation process were also studied.

Solid-Phase Extraction was applied prior to the derivatization procedure as a clean-up of wines by using 2 different commercially available SAX and C₁₈ cartridges to improve the accuracy and the precision of the method.

The linearity range (500 µg l⁻¹ to 10 mg l⁻¹) and detection limits (between 100 and 300 µg l⁻¹) of this method were similar to the standard pre-column automated *o*-phthalaldehyde derivatization method.

The method was checked with several red wines from Tarragona by comparing the results with the standard pre-column method.

INTRODUCTION

Biogenic amines are found in various foods and beverages, such as wine, beer, fish and meat, normally as a result of enzymatic degradation or fermentation processes [1-3].

They can cause direct or indirect toxicity when their concentration levels are high. For this reason, several countries have established regulations about their intake content in various kinds of foods [4]. Furthermore, in alcoholic beverages it is important to take into account the synergical effect that there seems to be between the amines and ethanol [5].

Many analytical methods based on different techniques have been described for determining the biogenic amine content in foods, but high performance liquid chromatography (HPLC) is the one preferred using either pre-column [6, 7, 8] or post-column [9] derivative procedures, using Dansyl Chloride (DnsCl) [10] or *o*-phthalaldehyde (OPA) [11-13], among others [14, 15] as fluorescence labelling reagents.

The most important advantage that OPA has over other derivatization reagents is that it reacts with amines quickly, and enables the biogenic amines to be detected at fmol levels. However, it has the drawback that it only reacts with primary amines to give unstable derivatives. For this reason, the pre-column methods have certain drawbacks, such as the need for carefully controlled reaction conditions, so affecting the reproducibility, and expensive equipment such as an automatic injector in the HPLC system for derivative formation. In the post-column methods, an additional pumping system is needed to carry the analyte from the column to the detector. The on-column methods avoid the problems that other methods have, and the results obtained seem to be satisfactory.

Since OPA has the most commonly accepted advantages, an on-column derivatization method [16, 17] has been developed to simplify the instrumentation usually needed in other derivatization procedures.

The column used is the determining factor in the on-column methods, because the derivatization must be performed in it. When using OPA as the derivatization reagent, the analytical column has to be resistant to alkaline mediums. So a polymeric reversed-phase column was selected as it is tolerant towards alkaline eluent.

Furthermore, it is difficult to determine amines in wines because the matrix is very complex. So clean-up or preconcentration steps must be undertaken prior to chromatography. Many analytical methods include these steps, by using mainly liquid-liquid extraction (LLE) [18, 19] or solid-phase extraction (SPE) [6, 10, 13] when isolating of biogenic amines in wines. LLE procedures use different mixtures of organic solvents to improve selectivity with good results, although this usually involves tedious preparation steps. On the other hand, SPE has used several stationary phases based on anionic [20] or cationic [6, 14] exchangers and octadecylsilane groups [9], as well as combinations of both [13].

The aim of this work is to find an on-column derivatizing method for simultaneously determining eight enologically important biogenic amines. A polymer-supported C_{18} column with a mobile phase containing the OPA reagent was used, and a clean-up step using anionic and octadecylsilane cartridges was introduced before separating the studied compounds.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

The eight amines studied were: methylamine, histamine, ethylamine, tyramine, putrescine, cadaverine, phenethylamine and 3-methylbutylamine

all of which were supplied by Aldrich-Chemie (Beerse, Belgium). An individual standard solution of 2000 mg l⁻¹ of each amine was prepared in HPLC-grade acetonitrile (Scharlau, Barcelona, Spain) and stored in darkness at 4°C. Solutions for further studies were prepared by diluting these standard solutions with water which was purified using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

The acetonitrile (ACN), tetrahydrofuran (THF) and sodium tetraborate used in the preparation of the chromatographic mobile phase were of HPLC grade (Scharlau). N-acetylcysteine (NAC) and OPA were supplied by Fluka Química (Madrid, Spain), whereas β -mercaptoethanol (ME) was supplied by Aldrich-Chemie (Beerse, Belgium).

Equipment

Chromatographic experiments were performed using a Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany) 1050 liquid chromatograph with an HP model 1046A fluorescence detector. The samples were injected with an HP Series 1050 automatic injector.

Separation was performed using an Asahipack OP-50 cartridge (250 x 4.6 mm I.D., particle size 5 μ m) supplied by Hewlett-Packard. Chromatographic data were collected and recorded on an HP Vectra 5/100 implemented with the Chemstation Software version B. 01.02.

High-performance liquid chromatographic method

Three solvent reservoirs containing the following eluents: (A) 5 mM borate solution (pH 9) with 1% THF, (B) 5 mM borate solution (pH 9) with 12 mM

min	% A	% B	% C
0	70	15	15
10	70	15	15
11	80	-	20
27	80	-	20
28	75	-	25
40	75	-	25

Table I. HPLC elution programme. A: 5 mM borate (pH 9)/1% THF; B: 12 mM OPA-NAC/ 5 mM borate (pH 9); C: ACN

OPA-NAC and (C) ACN were used to separate all the amines with the HPLC gradient elution shown in Table I.

The flow-rate was fixed at $0.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, so as not to exceed the upper limit of the column pressure. Eluents (A) and (B) were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ nylon membrane (Millipore).

The eluted OPA-derivatives were detected by monitoring their fluorescence using 340 nm and 450 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively.

The analytical chromatographic column was thermostated at 40°C throughout the experiment. Under these conditions all eight amines were eluted in less than 40 min.

Solid-phase clean-up

Solid-Phase Extraction (SPE) experiments were performed using a Visiprep DL disposable liner solid phase extraction vacuum manifold with individual flow control valves from Supelco (Bellefonte, PA, USA) which enabled twelve SPE tubes to be dried at a time.

C₁₈ and SAX cartridges (500 mg, Varian, Harbor City, CA, USA) were used to remove interfering compounds such as amino acids and polyphenols from wine. They were activated with two fractions of 3 ml of methanol, and further conditioned with two fractions of 5 ml of Milli-Q-purified water and dried before sample elution. After the sample had been eluted, water was passed through the cartridge so that the same volume was obtained and reproducibility was not lost.

RESULTS AND DISCUSSION

The determination of biogenic amines by HPLC has usually been carried out with fluorescence derivatization reagents, such as OPA, mainly because they react quickly with amines, as has been already mentioned.

In previous works, OPA has been used with pre-column HPLC techniques, which require additional expensive equipment such as an automatic injector, among other things. When on-column derivatization procedures are used, the reaction is completed when the OPA contained in the mobile phase reaches the analyte in the injection loop. OPA and borate concentrations, the thiol used in the indole formation and the percentage of acetonitrile, pH and column temperature in the mobile phase, were the parameters studied to optimize the OPA-labelling reaction. All the experiments were carried out by analyzing a red wine fortified with 10 mg l⁻¹ of the amines.

In the first part of this report the separation of the compounds was optimized. Given that the eight OPA-derivatives obtained from amines have different polarities, it was necessary to vary the percentage of organic solvent in the mobile phase. A single linear gradient elution could not be used because of the baseline drift, but it was alternated with several isocratic

elutions at different chromatographic times. Besides the OPA eluent which was halted at min 11 to decrease the baseline drift as the ACN percentage increased, the mobile phases used were always made up of different ACN and borate fractions so that the alkalinity needed for the derivatization and the polarity were suitable for eluting the analytes.

Before gradient optimization, parameters such as the active thiol which are indispensable for the OPA-labelling reaction were studied. β -mercaptoethanol has been widely used [7, 12], although NAC [16, 17] as well as other thiols [21] have also been used. In this work, NAC was selected because it results in a more stable baseline with only a faint odour, whereas the β -mercaptoethanol is a smelly liquid and difficult to handle.

Since the most polar amine derivatives can coelute with other polar compounds present in wine, such as polyphenols and aminoacids, the proportion of organic solvent during the initial chromatographic separation must be enough for them to be separated. Several percentages of ACN were tested and the best results were obtained with an initial proportion of ACN of 15%.

As the reaction between amines and OPA is almost instantaneous, the OPA-derivatives are formed when the analyte comes into contact with the mobile phase. For this reason, the OPA eluent does not need to be continuously pumped throughout the chromatogram, and at minute 11 the percentage of OPA is eliminated. The change in the baseline fluorescence is observable because a peak appears in the middle of the chromatograms.

Afterwards, other parameters which are important in the OPA-labelling reaction and the separation of the compounds analysed, were examined. First of all, it must be taken into account that fortified wines will be

optimized in order to ensure the efficacy of the analytical method proposed for the samples analysed. For all the experiments, a red wine spiked with 10 mg l⁻¹ of the biogenic amines was used, and subsequently checked with amine standard solutions.

The OPA-NAC concentration was the first variable tested. The molar ratio of OPA and NAC was always set at equivalence, so were optimized together. Firstly, the concentration had to be enough to derivatize the amines when large amounts of other compounds that could be derivatized appeared in real samples. The concentrations tested ranged between 0.5 and 5mM according to other studies [16, 17]. The capacity factors (*k'*) (Fig 1a) and the areas (Fig 1b) of the amines in the fortified wine were represented vs OPA-NAC reagent concentration. No significant differences were observed among *k'* at different concentrations. For histamine there was a little change in the response but there was no change in the responses of the rest of the amines between 2 and 5 mM. For this reason, 2 mM OPA-NAC was chosen as it is enough to derivatize all the amino compounds in real samples.

The pH of the mobile phase was the second parameter tested. The values tested were between 8 and 11 in order to assure the formation of derivatives, since the OPA-derivatization of amines is generally best carried out at alkaline pH. Fig. 1c gives the *k'* of the amines when the pH was changed. Fig. 1d (area response variations) shows that at pHs lower than 9 and higher than 10, most of the amines had lower responses. Since best results were obtained between 9 and 10, pH 9 was chosen for subsequent work.

The concentration of borate was also checked at the optimized pH. The concentrations tested ranged between 5 and 50mM, since these were the concentrations used in previous studies. As in the previous variables, the *k'* (Fig 1e) and the variation of the areas (Fig 1f) were represented vs the

variable studied. Fig. 1e shows that the k' increased as the borate concentration rose. Furthermore, similar areas (Fig. 1f) were obtained at different concentrations. Since borate 15mM did not significantly decrease the derivative responses, and the retention times slightly increased as the borate concentration rose, it was fixed as the optimum.

The last parameter examined was the column temperature. The values tested were 35°C, 40°C and 45°C. At higher values the resolution of the chromatographic peaks did not improve and the column durability would decrease. Fig 1g and 1h show the k' and the area vs temperature, respectively, for all the amines. There were no differences among the temperatures tested, although above 45°C there was a slight tendency to decrease. Symmetrical peaks were obtained at all temperatures. Neither did the temperature affect the derivatization yield, the areas being similar in all cases. Thus, 40°C was fixed for subsequent analysis.

When experimental conditions were determined, a sample aliquot of 5 μ l was subject to HPLC determination. Fig 2a shows the chromatogram of the analysis of 1 mg l⁻¹ of amine standard solution under the conditions outlined. As can be seen, two baseline distortions appear as a consequence of the percentage of organic solvent changes, although they do not interfere with the peaks of the analytes. When dealing with wines, the attenuation was changed in these zones in order to obtain a good baseline. This did not affect the chromatographic areas of the analytes, as it was done exactly at the chromatographic times corresponding to the aforementioned distortions, and the initial attenuation returned to immediately afterwards.

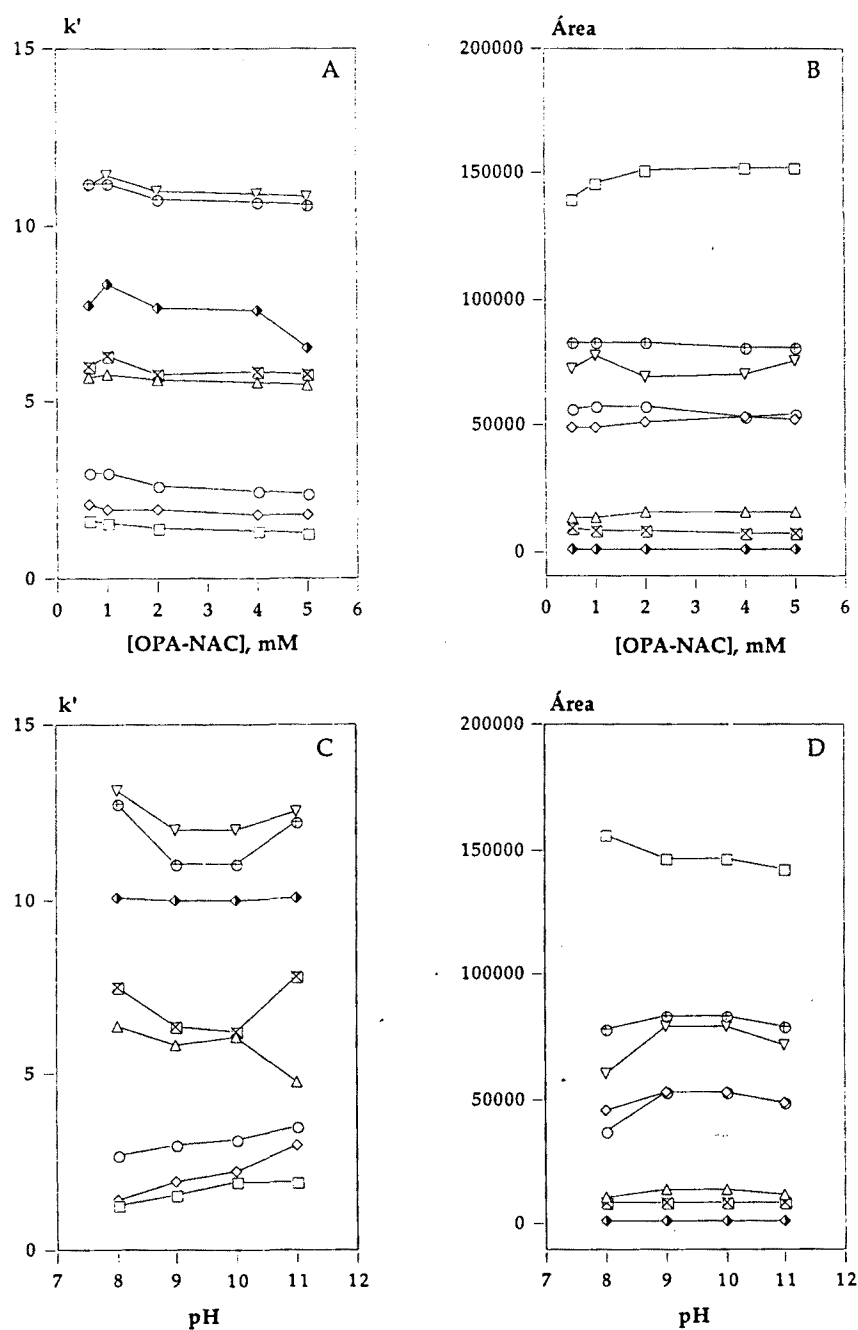


Fig. 1. Effects of a,b) OPA-NAC concentration; c,d) pH; e,f) borate concentration and g,h) column temperature on the capacity factors and on the HPLC area peaks, respectively, of the biogenic amines. Isoamylamine; ▽ Tyramine; Δ Phenethylamine; ◇ Methylamine; ○ Ethylamine; ◇ Cadaverine; Histamine; ◇ Putrescine

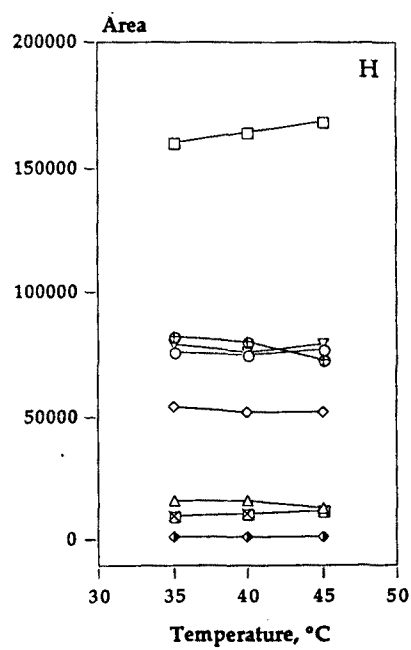
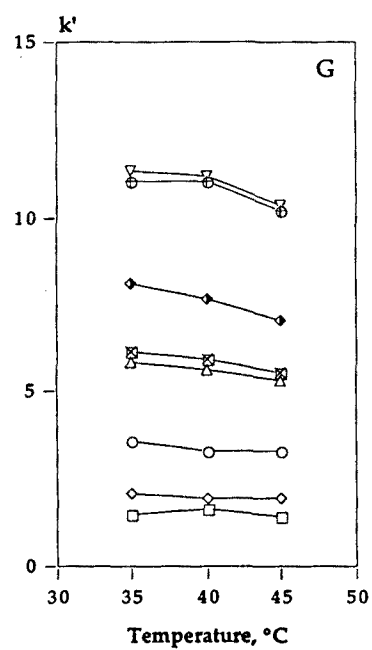
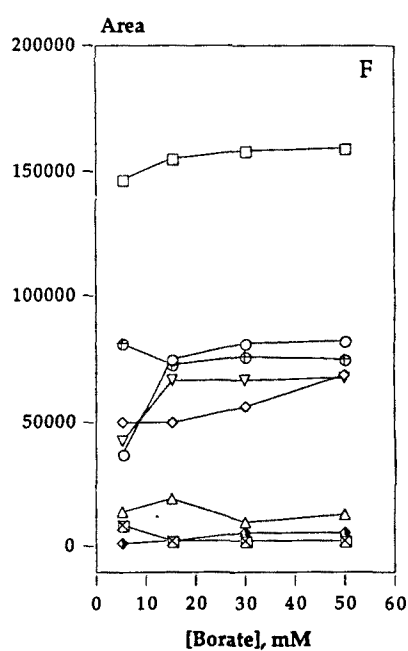
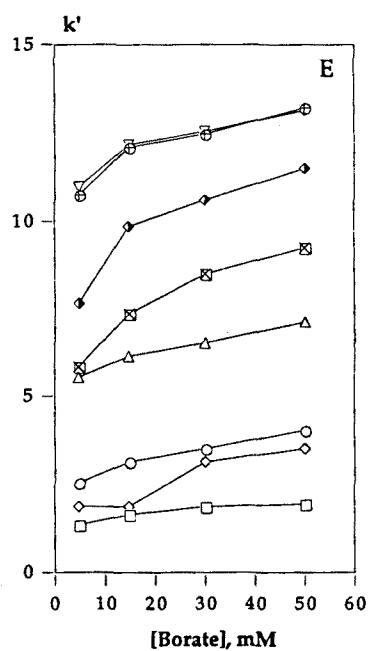


Fig. 2b and 2c show the chromatograms obtained when a red wine and the same sample spiked with 10 mg l⁻¹ of the amines were analyzed. The first one shows that histamine, methylamine, ethylamine and putrescine are present in this wine, and this is confirmed with a subsequent standard addition. As can be seen, at low concentrations, the peak that elutes between histamine and methylamine prevents them from being quantified. Furthermore, ethylamine is overlapped by another unknown peak. So, to determine these analytes a clean-up step had to be done to prevent these interferences. Two solid-phase extraction cartridges, a non polar (C₁₈) and a strong anion-exchanger (SAX), were used.

In previous studies [13], octadecylsilane (C₁₈) and quaternary ammonium groups had been used to remove large amounts of polyphenols from samples by slight modification of the sample pH.

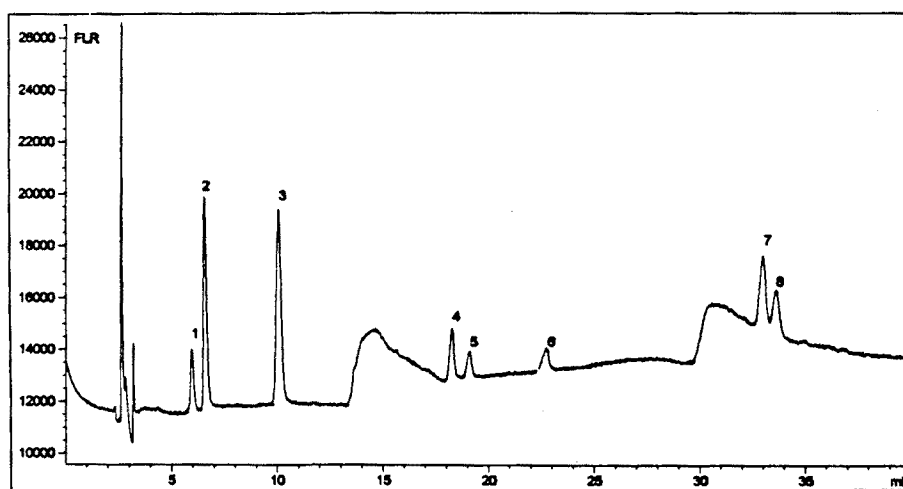


Figure 2a

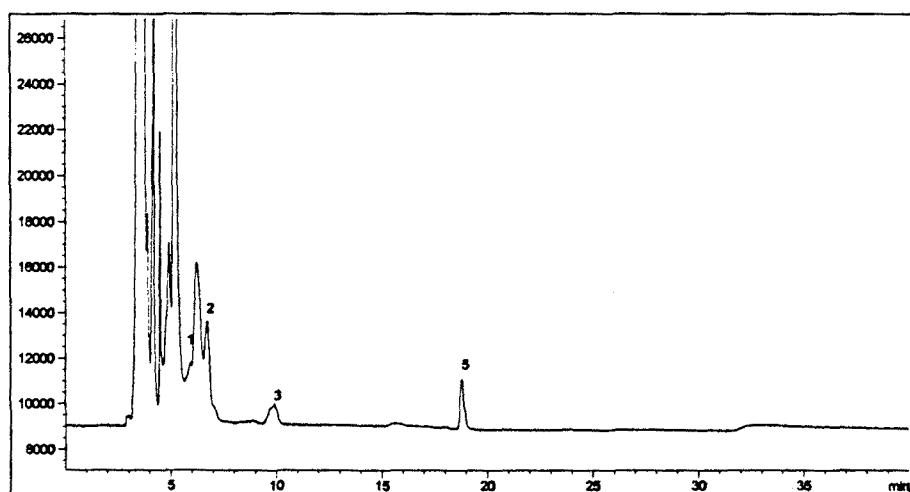


Fig. 2b

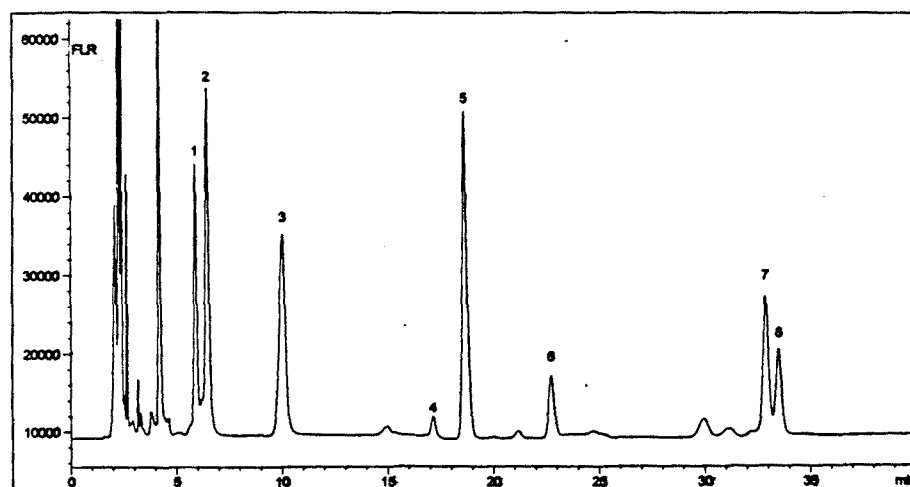


Figure 2-a) Chromatogram of a standard sample of 1 mg l^{-1} of the biogenic amines after on column derivatization with OPA: (1) histamine, (2) methylamine; (3) ethylamine; (4) tyramine; (5) putrescine; (6) cadaverine; (7) isoamylamine and (8) phenethylamine. B) Chromatogram obtained from the on column derivatization of a red wine without SPE treatments. C) Chromatogram obtained from the on column derivatization of a red wine spiked with 10 mg l^{-1} of the biogenic amines and without SPE treatment.

C₁₈ cartridges: The stationary phase was used to eliminate non polar compounds. A 5-ml volume of a red wine was processed without treatment. Polyphenolic and other non polar compounds were retained in the cartridge, while the eluate conserved the amines. A 5- μ l aliquot was then injected. Fig. 3a shows the chromatogram obtained when the C₁₈ eluate of the red wine shown in Fig. 2b was injected. As can be seen, the peak that appeared between histamine and methylamine decreased and both peaks were accurately quantified. Furthermore, the peak corresponding to ethylamine was well defined.

SAX cartridges The same study was carried out but this time the ionic compounds were eliminated. A 5-ml portion of a red wine was adjusted to pH 8 in order to retain polyphenolates and amino acids which had been converted into their anionic forms. As in the previous experiment, 5 μ l of the eluate were then injected.

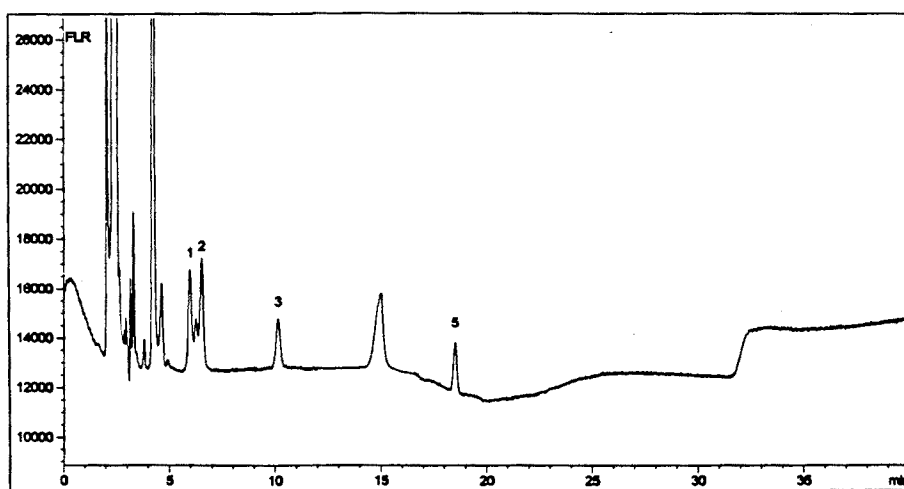


Fig. 3a

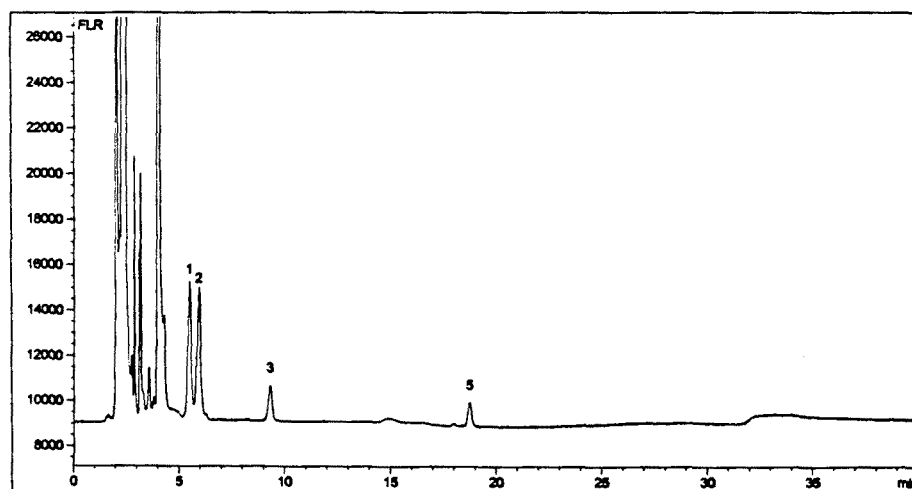


Figure 3. Chromatogram obtained from the on column derivatization of the same red wine given in fig. 2B after a) C_{18} and b) SAX clean up. For peak assignation, see fig. 2.

Fig. 3b shows the chromatogram of the same red wine shown in fig. 2b, but after SAX treatment. As can be seen, all of the peaks of interest are well defined, as most of the interferences were prevented.

Table II gives the recoveries obtained when the clean up step was done on a red wine spiked with 5 mg l^{-1} of the amines. As expected, both SPEs showed good results. However, histamine, methylamine and cadaverine were better recovered when SAX treatment was applied, perhaps due to the anion exchangers selectively retaining polyphenolates and some fairly ionized amino acids at alkaline pH. Putrescine was also better recovered when C_{18} extraction was applied. It can be observed that the histamine/methylamine interference shown in chromatogram 2b has almost disappeared in fig 3a and has been wholly removed in fig 3b, with no important analyte losses.

AMINE	C ₁₈		SAX	
	R	RSD	R	RSD
histamine	70	7.2	100	3.1
methyllamine	65	8.5	98	5.3
ethylamine	105	4.5	95	4.5
tyramine	102	4.3	100	3.5
putrescine	100	3.9	75	6.6
cadaverine	80	5.7	100	3.0
isoamylamine	100	3.5	102	4.1
phenethylamine	105	4.1	103	4.5

Table II. Percentage of recoveries with octadecylsilane and ammonium anion exchangers (R & RSD in %). Results from triplicate analyses of a red wine spiked with 5 mg l⁻¹ of the amines. Conditions given in text.

Thus, in order to verify the linearity of the response of the different derivatives, including SAX treatment, at the previously specified wavelengths for the working concentrations, standard solutions of amines that ranged between 0.1 and 15 mg l⁻¹ were prepared and injected. The linearity was calculated by means of an external standard method. Linear least-squares regression was used to calculate the slope, intercept and correlation coefficient (r^2) by using the ULC computer program [22]. All the calibration lines showed ranges of linearity ($r^2 > 0.998$) between 0.5 and 5 mg l⁻¹.

The detection limit was calculated from the amount of amines required to give a signal-to-noise ratio of 3 and was found to be between 0.1 and 0.3 mg.l⁻¹ for all the biogenic amines. The quantification limit was established at 0.5 mg.l⁻¹ and was fixed as the first point in the calibration graphs.

The reproducibility and the repeatability of the on-column derivatization technique were considered either with 1 mg l⁻¹ of an amine standard solution in acetonitrile or an amine-free red wine spiked with 1 mg l⁻¹ of each amine.

The repeatability analyses (n=5) of amines gave relative standard deviations (RSD) below 5% for the peak area and below 1% for the retention times, in both cases. The reproducibility was examined in the same way but the analysis took place over different days. The results were slightly higher than repeatability and did not exceed 10% in any case.

The repeatability and the reproducibility of the method including the SAX clean up treatment, were also tested. The results obtained were below 8% for the peak area and below 1% for the retention times in both parameters studied.

The overall method was applied to determine the biogenic amine content of 5 red wines from Tarragona (see Table III). The results were compared with the ones obtained by automatic injection of the amines after OPA derivatization, as this is the method which is usually used in this kind of determination [6, 7, 13]. The two sets of data showed no differences between them, having RSDs lower than 5% in all of them. Histamine, methylamine, ethylamine and putrescine were found in all the samples analyzed whereas none showed contents of tyramine, isoamylamine or phenethylamine over their detection limits.

	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5	
AMINE	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
histamine	1.6	1.9	1.0	1.8	1.3	1.6	2.4	3.0	0.6	0.9
methylamine	1.1	1.2	0.9	1.0	1.0	1.4	3.8	4.3	1.1	1.7
ethylamine	1.4	1.9	1.3	1.5	0.8	1.0	1.3	1.7	1.2	1.7
putrescine	5.3	6.1	4.3	5.0	5.0	5.9	4.1	5.0	4.8	5.2

Table III. Mean (mg l⁻¹) of the amine concentrations obtained from the triplicate analyses of 5 red wines from Tarragona. Quantification after applying *the combined on column/SAX method and ^bthe pre column automated method

CONCLUSIONS

The method described seems to be suitable for the determination of eight biogenic amines in wines. It involves an easy, fast clean-up step with strong anion exchanger cartridges to avoid chromatographic interferences.

The on column derivatization technique appears to be a good alternative to the classical pre column derivatization procedure, since it obtains good results with simpler equipment, which is specially important in enological laboratory work.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to thank CICYT (project ALI 94-0505) for the financial support given.

REFERENCES

- [1]. M.C. Vidal and A. Mariné. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 25 (1983) 59
- [2]. R.E. Subden, R.G. Brown and A.C. Noble. *J. Chromatogr.* 166 (1978) 310
- [3]. S. Moret and R. Bortolomeazzi. *J. Chromatogr.* 591 (1992) 175
- [4]. O. Busto, J. Guasch and F. Borrull. *J. Internat. Sci. Vigne Vin*, in press
- [5]. H. Suomalainen, K. Eriksson & L. Nykkanen. *Am. J. Enol. Vitic.* 25 (1974) 179
- [6]. O. Busto, M. Mestres, J. Guasch and F. Borrull. *Chromatographia* 40 (1995) 404
- [7]. M.J. Pereira and A. Bertrand. *Bull. OIV* 765-766 (1994) 918
- [8]. T. Bauza, A. Blaise, J.P Mestres, P.L Teissedre, F. Daumas and J.C. Cabanis *Sci Aliment* 15 (1995) 367
- [9]. M. Izquierdo, M.C. Vidal & A. Mariné. *J Assoc Off Anal Chem* 76 (1993) 1027
- [10]. O. Busto, Y. Valero, J. Guasch and F. Borrull. *Chromatographia* 38 (1994) 571
- [11]. Ch. Tricard and J.M. Cabazeil. *FV OIV* 850 (1990)
- [12]. P. Lehtonen, M. Saarinen, M. Vesanto and M. Riekkola, *Z. Lebensm. Unters Forsch.* 194 (1992) 434
- [13]. O. Busto, J. Guasch and F. Borrull. *J Chromatogr* 718 (1995) 309
- [14]. O. Busto, M. Miracle, J. Guasch & F. Borrull. *J Liq Chromatogr*, to be published
- [15]. O. Busto, J. Guasch and F. Borrull. *J Chromatogr*, in press

- [16] K. Saito, M. Horie, K. Nakagomi and H. Nakazawa. *Anal. Sci.* 8 (1992) 675
- [17] K. Saito, M. Horie and N. Nose. *J Chromatogr.* 595 (1992) 163
- [18] P. Lehtonen. *Z. Lebensm. unters Forsch.* 183 (1986) 177
- [19] K. Mayer and G. Pause, *Bull. OIV FV* 850 (1990)
- [20]. M. Calull, R.M. Marcé, J. Fábregas & F. Borrull. *Chromatographia*, 31 (1991) 33
- [21] J. Kehr. *CMA/Microdialysis AB. Application Note* 16 (1993)
- [22]. R. Boqué and F.X. Rius. *J. Chem. Educ.* 70, 230 (1993)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

CONCLUSIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

La información bibliográfica recogida durante la realización de esta Tesis Doctoral permite afirmar que la analítica de las aminas biógenas hoy día está gobernada por la cromatografía líquida de alta resolución y, más concretamente, por la que se realiza en fase inversa. Los mecanismos de separación, mayoritariamente realizados previa derivatización de las aminas con *o*-ftaldialdehído, permiten llegar a los límites que la normativa considera indicativos de una eventual alteración de la calidad del producto analizado, en nuestro caso el vino.

No existe hasta el momento un método reconocido oficialmente como el método estándar de determinación de aminas biógenas en el vino, aunque se vislumbra la intención de que la OIV apruebe como tal el de la derivatización precolumna realizada automáticamente, empleando como reactivo derivatizante el OPA y como medio de detección la fluorimetría. Todos los datos de contenidos de aminas biógenas recogidos en la bibliografía apuntan a que con él se consigue analizar con precisión el contenido de aminas biógenas mayoritarias. Sin embargo, aunque no se considera la posibilidad de efectuar un sistema de *clean up* previo a la derivatización, la extracción en fase sólida permitiría una mejora en la detección y cuantificación de los analitos, además de posibilitar la determinación simultánea de aminas minoritarias mediante un proceso de concentración.

En aras de obtener mejoras en la sensibilidad de los métodos (no olvidemos que los límites legales casi siempre están ligados a intereses de mercado, si exceptuamos aspectos estrictamente médicos), se han propuesto otros mecanismos de trabajo como son la síntesis de nuevos derivatizantes, la manipulación de los procesos de separación y derivatización, la implementación de los equipos, ... Todas estas modificaciones aportan

importantes conocimientos que permiten avanzar en la línea de obtención de métodos analíticamente más fiables, tal y como comentábamos en la introducción. En esta línea se han desarrollado todos los trabajos que han constituido esta Tesis Doctoral.

Respecto a los estudios concretos realizados en la parte experimental, podemos considerar que se ha progresado en el perfeccionamiento de las técnicas de extracción en fase sólida, aplicadas hasta este momento de forma esporádica al *clean up* del vino y, en muy raras ocasiones, a la concentración de alguno de sus componentes.

Podemos considerar, por tanto, que en esta Tesis Doctoral se ha avanzado en la línea de obtención de nuevos métodos de cuantificación de aminas biógenas en vinos, especialmente las consideradas como minoritarias.

Se ha juzgado adecuado, puesto que se conjugan y relacionan varios métodos analíticos a lo largo de toda la memoria, dividir las conclusiones en una serie de apartados en los que se evaluarían la eficacia del derivatizante, el método de separación y detección (instrumentación utilizada) y los procedimientos de *clean up* y concentración empleados.

Solamente se indican aquellas conclusiones que se derivan del trabajo en sí, sin entrar en la discusión de factores que, a pesar de haberse constatado a lo largo de la realización de la tesis, ya se encuentran registrados en la bibliografía.

DERIVATIZACIÓN

- 1.- La sensibilidad resultante del proceso de derivatización con AQC es semejante a la obtenida mediante derivatización con OPA y superior a la que resulta de la reacción entre las aminas y el DnsCl.
- 2.- La derivatización *on line* con OPA es una técnica muy eficaz para determinar aminas biógenas. Su rapidez de reacción, permite realizar la derivatización *on column*, proporcionando resultados comparables a los de la técnica convencional pero empleando una instrumentación más simple.
- 3.- El AQC se ha revelado como un potente derivatizante que permite determinar aminas primarias y secundarias en un único proceso de forma sencilla y rápida. Dada su reciente aparición (1993), en esta tesis doctoral se ha aplicado por vez primera al análisis de vinos demostrándose la viabilidad de su utilización. Su tiempo de reacción, ligeramente superior al del OPA y, sobre todo, la estabilidad de sus derivados, hace posible plantearse efectuar la reacción *on line* u *off line*, aunque en este trabajo solamente se ha aplicado la primera de ellas. Entre sus limitaciones cabe destacar la interferencia del pico de exceso de reactivo, así como de otros subproductos de reacción.

SEPARACIÓN

- 1.- La baja polaridad del OPA-derivado de la histamina, hace que éste eluya en la zona cromatográfica de los derivados polares de los aminoácidos, con lo que su cuantificación puede resultar difícil si se analiza por inyección directa. Por su parte, la polaridad mostrada por el AQC-derivado de la histamina hace que éste eluya en una zona

Conclusiones

relativamente alejada de la de elución de los derivados de los aminoácidos, por lo que se cuantifica más fácilmente que el OPA-derivado.

- 2.- El exceso de AQC en un sistema convencional del RP-HPLC y detección fluorescente, puede interferir en el cromatograma al igual que ocurre con el exceso de DnsCl. El OPA ofrece, en este sentido, mejores posibilidades.
- 3.- El inevitable desgaste de la columna analítica evidenciado a lo largo de la experimentación con AQC, hace que los tiempos de elución de las aminas varíen de forma notable si no se efectúa una limpieza periódica de la columna cuando ésta ha sido utilizada repetidas veces.

CLEAN UP

- 1.- La SPE se ha planteado como alternativa a la tradicional LLE, demostrándose la aplicabilidad de los cartuchos comerciales de C₁₈, SAX y SCX en la concentración y *clean up* de las muestras de vino. El uso de las estaciones de vacío que permiten una semiautomatización del proceso y que conllevan la posibilidad de tratar numerosas muestras simultáneamente, ha permitido aislar con facilidad los analitos de la matriz y/o eliminar interferencias de la misma en procesos realizados tanto pre- como post-derivatización.
- 2.- Los cartuchos de octadecilsilano han permitido extraer y preconcentrar de forma cuantitativa los dansilderivados de las aminas presentes en el vino, lo cual ha hecho posible concentrar selectivamente estos compuestos mediante una posterior evaporación a vacío.

- 3.- Los adsorbentes de octadecilsilano han retenido eficazmente los polifenoles de los vinos, permitiendo una posterior concentración de las aminas en cartuchos de C_{18} previa formación del par iónico decanosulfonato-amina, lo cual a su vez ha permitido efectuar la concentración de forma simultánea al proceso de *clean up*, evitando el siempre tedioso uso del rotavapor.
- 4.- También se ha demostrado la eficacia de los cartuchos de intercambiadores aniónicos fuertes (SAX) en la eliminación de polifenoles a pH básico. Eliminación, por otra parte, más efectiva que la mostrada por los de C_{18} .
- 5.- Si se controla adecuadamente el pH de la muestra, los SAX adsorben aminoácidos ionizados que pueden interferir en el posterior análisis cromatográfico de las aminas, como así se ha demostrado en el último trabajo.
- 6.- Los intercambiadores catiónicos fuertes (SCX) se han constituido en alternativa al tradicional uso de la Amberlite CG 50, a pesar de que solamente han permitido realizar el *clean up* simultáneo al proceso de concentración de aminas en el caso de efectuar la elución con un tampón en medio básico. Cuando la elución se efectúa en medio ácido, la Amberlite permite efectuar el *clean up* sin pérdidas notables de putrescina y cadaverina, a diferencia de lo que ocurre con el SCX.
- 7.- La polivinilpirrolidona (PVP) es un decolorante muy utilizado en la industria enológica para eliminar los polifenoles del vino. Su uso en este trabajo ha permitido soslayar la presencia de estos compuestos en los procesos de concentración de las dansilamidas en cartuchos de C_{18} . No obstante, la decoloración conseguida no es superior a la resultante

del tratamiento con C_{18} o SAX a pH básico (para volúmenes de muestra inferiores a 15 ml) y exige un tratamiento manual, difícilmente automatizable.

INSTRUMENTACIÓN

- 1.- La derivatización con OPA *on column* no requiere una sofisticada instrumentación, dado que también es suficiente con disponer de un equipo convencional de HPLC con un detector de fluorescencia. Para un número reducido de analitos, la elución en sistema isocrático, supondría una ventaja adicional del método (determinación de histamina, por ejemplo).
- 2.- La derivatización precolumna con AQC no exige el uso del inyector automático, por lo que podría prescindirse del uso del sistema de derivatización automatizado.
- 3.- Respecto al fungible que representan las columnas analíticas de octadecilsilano soportado sobre sílice, el AQC es el reactivo que más desgaste supone para las mismas. Por el contrario, las columnas de base polimérica son las más duraderas, dada su menor dependencia del pH.

LÍMITES DE DETECCIÓN

- 1.- Los límites de detección obtenidos de la aplicación de los métodos propuestos oscilan entre los 5-50 $\mu\text{g l}^{-1}$ observados por inyección directa de los patrones tras la derivatización con AQC y los 50-150 $\mu\text{g l}^{-1}$ obtenidos por inyección directa de los patrones tras derivatizar con DnsCl. Para la inyección directa de patrones derivatizados con OPA, los límites de detección se sitúan entre 25 y 50 $\mu\text{g l}^{-1}$.

- 2.- Los valores de los *LOD* cuando se analizan vinos derivatizados por inyección directa se hallan siempre en el intervalo de los 100-500 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, independientemente del derivatizante empleado. Obviamente, estos límites se rebajan uno o dos órdenes de magnitud cuando se aplican las técnicas de *SPE* propuestas. El método que mejores límites de detección consigue en muestras reales (entre 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ y 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ para todas las aminas) es el de derivatización con AQC previa *SPE* con SCX.
- 3.- Los métodos ensayados han presentado límites de cuantificación adecuados para la determinación de aminas biógenas en vinos a niveles de algunas décimas de mg l^{-1} .

PRECISIÓN

La precisión de la cuantificación (RSD) de los métodos cromatográficos aplicados ha oscilado entre valores inferiores al 5% para la repetibilidad y ligeramente superiores al 5% en términos de reproducibilidad entre días. Cuando se aplican los procesos de *SPE* los valores de reproducibilidad aumentan ligeramente, aunque sin superar en ningún caso el 10%.

APLICACIÓN

De los análisis realizados, se llega a la conclusión de que es mayor el contenido de aminas biógenas en los vinos tintos que en los rosados o blancos. A pesar de ello, los datos de concentración de aminas consideradas mayoritarias (como la histamina o la putrescina) exceden raramente los 5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, siendo el valor medio más generalizado 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

El análisis exploratorio realizado mediante la técnica de *Box-and-whisker* no correlaciona la presencia de una o varias aminas biógenas ni entre sí ni con

Conclusiones

la variedad o la procedencia del vino. Este estudio, no obstante, no puede considerarse concluyente, puesto que habría sido necesario controlar otras variables que pudieran determinar su influencia en la presencia de aminas biógenas en el vino por estar implicadas en la elaboración del mismo.

EPÍLOGO

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

A lo largo de toda la memoria de la Tesis, la Química ha gozado del protagonismo que merece un trabajo cuya autora aspira a merecer el grado de Doctor en Química.

No obstante, no quisiera cerrar estas páginas sin dedicarle al vino un pequeño homenaje por ser ese sujeto pasivo que ha soportado estoicamente mis experiencias, a veces afortunadas, a veces menos afortunadas.

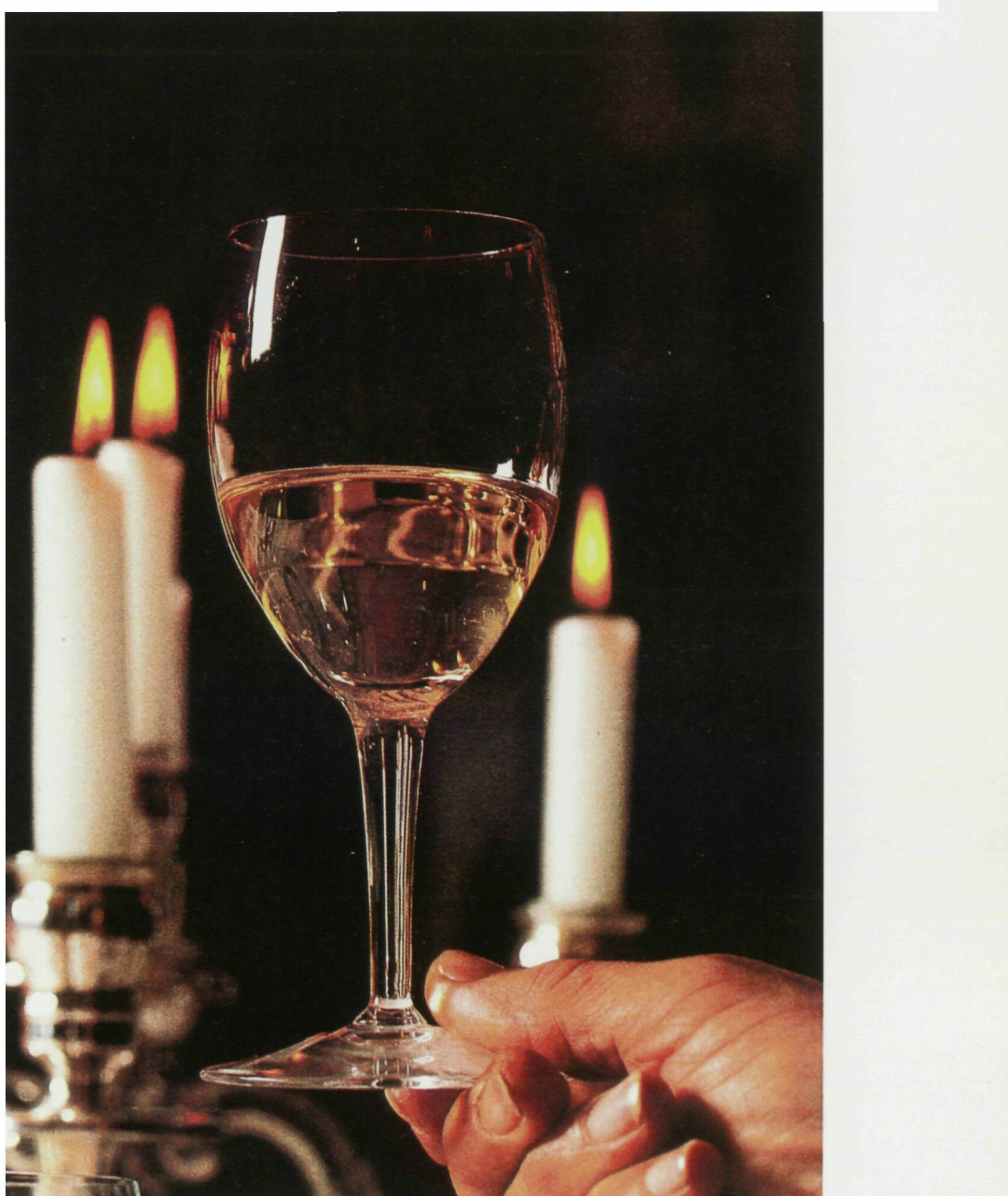
No se me ocurre mejor final que conjugar la poesía de Neruda, uno de los poetas que más ha cantado al vino, con una de las mejores fotografías que he tenido ocasión de contemplar mientras preparaba la redacción de esta memoria. Está extraída del libro *Le Vin et Les Jours* que Émile Peynaud, un químico patriarca de la Enología, escribió en el año 1988 y cuya lectura recomiendo fervorosamente por el carácter interdisciplinar que le da al estudio del vino: la Enología se erige en un compendio de ciencias y técnicas que convergen en el deseo de elaborar un producto que agrade al consumidor que es quien, en definitiva, decide.

Espero que ambas, la poesía y la imagen, inspiren en el lector el mismo sentimiento de admiración que me inspiraron a mí.

*Vino color de día, vino color de noche,
vino con pies de púrpura o sangre de topacio,
vino, estrellado hijo de la tierra,
vino, liso como una espada de oro,
suave como un desordenado terciopelo,
vino encaracolado y suspendido,
amoroso, marino,
nunca has cambiado en una copa, en un canto, en un hombre,
coral, gregario eres, y cuando menos,
mutuo.*

*Fragmento extraído
de la Oda al Vino
de Pablo Neruda*





UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC
Olga Busto Busto
ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC

Olga Busto Busto

ISBN: 978-84-693-6292-1/DL:T-1602-2010

